



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCI ISOLADOS DA PELE DE CANÍDEOS

Radostina Nikolova Georgieva

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA:

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADORA:

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCI ISOLADOS DA PELE DE CANÍDEOS

Radostina Nikolova Georgieva

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo
Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba
Dra. Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA:

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADORA:

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

2012

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre presentes. O vosso amor e apoio incondicionais foram fundamentais.

A todos os meus amigos, por terem feito destes anos os melhores da minha vida.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Cristina Gaspar Lobo Vilela e Dra. Maria João Dinis da Fonseca por toda a orientação, ajuda e incentivo na criação e correcção deste trabalho. Obrigada acima de tudo por terem acreditado em mim e por me terem incentivado a ser melhor.

À Doutor Maria Manuela M. Oliveira um especial obrigada por toda a ajuda na organização e interpretação da parte prática desta dissertação.

Ao Dr. Jorge Cid e à Dra. Maria João Fonseca por me terem acolhido no seu hospital.

A todos os médicos veterinários do Hospital Veterinário do Restelo, Dr. Cid, Dra. Maria João, Dr. Diogo Magno, Dr. Hugo Pereira, Dra. Marina Coelho, Dra. Paula Santos, Dra. Maria Andrade, Dra. Ana Valença, Dra. Marta Cipriano, Dra. Catarina Archer, Dra. Cátia Barneto, Dra. Sofia Zamith, Dr. Simão Nabais, Dra. Someia Umarji, Dr. Miguel Ramos, Dra. Sofia Costa, Dra. Ana Eiras, Dr. Rui Rodrigues, Dr. Nuno Silva, Dra. Margarida Cid, Dra. Rita Figueiredo e Dra. Patrícia Lopes. A todos vocês um muito obrigada pelo muito que me ensinaram e pela paciência que tiveram com a minha ignorância.

A todos os enfermeiros e auxiliares do Hospital Veterinário do Restelo por todo o conhecimento e amizade.

À técnica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária, Carla Carneiro, muito obrigada pela ajuda imprescindível e paciência interminável.

“O desenvolvimento cultural de um povo mede-se pela forma como trata os seus animais.”

Mahatma Ghandi

RESUMO

O biofilme é um factor de virulência que confere vantagem evolutiva aos microrganismos que o possuem, uma vez que favorece a sua cooperação metabólica e permuta genética, além de lhes conferir protecção contra o sistema imunitário do hospedeiro e contra agentes antimicrobianos.

Este estudo teve como principal objectivo avaliar a capacidade de produção de biofilme de staphylococci isolados da pele de cão e relacioná-la com a sua antibiorresistência. Foram investigados 21 staphylococci colhidos no Hospital Veterinário do Restelo, 11 isolados de pele saudável (grupo 1) e 10 isolados de casos clínicos de dermatite (grupo 2).

As espécies maioritariamente identificadas foram *Staphylococcus epidermidis* (25%), *Staphylococcus aureus* (17%) e *Staphylococcus chromogenes* (17%) no grupo 1 e *Staphylococcus capitis* (50%), *Staphylococcus pseudintermedius* (30%) e *Staphylococcus chromogenes* (20%) no grupo 2.

A maioria das bactérias isoladas (90%) foi resistente a pelo menos 2 grupos de agentes antimicrobianos, sendo os compostos activos menos eficazes a penicilina G, a ampicilina e o ácido nalidíxico, com resistências entre 80% e 100%.

Verificou-se ainda que cerca de 40% dos staphylococci investigados são multirresistentes, não sendo susceptíveis a pelo menos 5 dos 7 grupos antimicrobianos investigados.

Quanto à produção de biofilme, 38,1 % dos isolados foi considerado positivo a este factor de virulência, tendo os staphylococci isolados de pele saudável expressado biofilme mais frequentemente (55%), do que os isolados de dermatites caninas (20%).

Foi ainda verificada uma correlação positiva entre a produção de biofilme e a antibiorresistência de vários grupos antimicrobianos, nomeadamente penicilinas, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfamidas, o que sugere que a aquisição de genes de resistência é maior no contexto de um biofilme do que nas células bacterianas equivalentes de vida livre.

Palavras-chave: staphylococci, biofilme, antibiorresistência, pele, dermatite, cão

ABSTRACT

Biofilm is a virulence factor which grants evolutionary advantage to microorganisms that possess it, once it favors their metabolic cooperation and genetic shift, besides granting protection against the host's immune system and antibiotics.

This study's purpose was to evaluate production capacity for biofilm by bacterial staphylococci isolates from canine skin, and relate it to antimicrobial resistance. Of the 21 isolates obtained from dogs at Hospital Veterinário do Restelo, 11 of which from healthy skin and the remaining 10 from dermatitis cases, the most frequently identified species were *Staphylococcus epidermidis* (25%), *Staphylococcus aureus* (17%) and *Staphylococcus chromogenes* (17%) in group 1 and *Staphylococcus capitis* (50%), *Staphylococcus pseudintermedius* (30%) and *Staphylococcus chromogenes* (20%) in group 2. Most of isolated bacteria (90%) were resistant to, at least 2 classes of antimicrobials, and the least efficient antibiotics were Penicillin G, Ampicilin, and Nalidixic Acid, with resistances rates between 80% and 100%.

A high level of multiresistance was observed, with 40% of all staphylococci being resistant to at least 5 of the 7 investigated antimicrobial groups.

Regarding biofilm expression, 38.1% of the isolates were considered to be positive to this virulence factor, with staphylococci isolated from healthy skin having expressed biofilm more frequently (55%) than those isolated from dermatitis cases (20%).

A positive correlation was shown between biofilm production and resistance to antimicrobial from several groups, namely penicillins, aminoglycosides, quinolones and sulfamids. This suggests that bacteria growing in biofilm acquire resistance genes more easily than planktonic cells of the same organism.

Keywords: staphylococci, biofilm, resistance to antibiotics, skin, dermatitis, dog

ÍNDICE GERAL

NOTA PRÉVIA	1
BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DO RESTELO	3
PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCI ISOLADOS DA PELE DE CANÍDEO REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. A pele do cão	7
1.1. Descrição geral da estrutura e funções da pele	7
1.2. A microbiota cutânea	8
2. Dermatite Bacteriana Canina	10
2.1. Conceito	10
2.2. Etiologia	10
2.3. Classificação	11
2.4. Factores de risco	12
2.5. Fisiopatologia	12
2.6. Diagnóstico	13
2.7. Tratamento	15
3. <i>Staphylococcus</i> spp.	18
3.1. Taxonomia	18
3.2. O papel dos staphylococci	19
3.2.1. Como bactéria residente	19
3.2.2. Como agente de infecção	19
3.2.3. Estrutura, fisiologia e patologia	20
3.2.4. Tratamento e multirresistências	23
4. Biofilme	26
4.1. Definição	26
4.2. Estrutura	26
4.3. Dinâmica de formação	28
4.4. Comportamento colectivo	32
4.4.1. Permuta Genética	33
4.4.2. <i>Quorum Sensing</i>	33
4.4.3. Predação e competição	35
4.5. Função	35
4.5.1. Protecção ambiental	35
4.5.2. Disponibilidade nutricional e cooperação metabólica	36
4.5.3. Aquisição de novas características genéticas	36

4.6.	O papel do biofilme nas doenças	37
4.6.1.	Destacamento celular	37
4.6.2.	Libertação de endotoxinas	38
4.6.3.	Resistência ao sistema imunológico do hospedeiro	38
4.6.4.	Formação de um nicho para uma geração de organismos resistentes	38
4.7.	O biofilme e a resistência microbiana	39
4.7.1.	Penetração retardada	40
4.7.2.	Diminuição da taxa de multiplicação bacteriana	41
4.7.3.	Outras mudanças fisiológicas devido ao modo de crescimento do biofilme	42
PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCI ISOLADOS DA PELE DE CANÍDEO		
TRABALHO LABORATORIAL		43
MATERIAL E MÉTODOS		45
1.	Amostragem	45
1.1.	População em estudo	45
1.2.	Crítérios de inclusão	46
1.3.	Método de colheita	47
2.	Processamento das amostras	47
2.1.	Isolamento bacteriano	47
2.2.	Identificação bacteriana	48
2.3.	Identificação da espécie	49
2.4.	Teste de sensibilidade a antibióticos	50
2.5.	Biofilme	52
3.	Tratamento estatístico dos dados	53
RESULTADOS		55
1.	Microrganismos isolados	55
2.	Identificação da espécie	57
3.	Teste de sensibilidade a antibióticos	59
4.	Capacidade de produção de biofilme	62
5.	Relação entre a produção de biofilme e a resistência antimicrobiana	65
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS		67
CONCLUSÃO		75
BIBLIOGRAFIA		77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> no interior de um neutrófilo (fagocitose) _	14
Figura 2 - Factores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> _____	22
Figura 3 - Processo de formação de biofilme_____	30
Figura 4 - Recolha de material de um animal do grupo 1 _____	47
Figura 5 - Cultura pura em meio COS _____	48
Figura 6 - Cocos de Gram positivo _____	49
Figura 7 – Painel bioquímico API 20 Staph preenchido_____	50
Figura 8 - Medição do halo de inibição de crescimento bacteriano _____	51
Figura 9 – <i>Staphylococcus epidermitis</i> <i>rp62a</i> em meio Vermelho de Congo utilizado como controlo positivo _____	53
Figura 10 – Teste de sensibilidade a agentes antimicrobiaos de <i>S. capitis</i> _____	59
Figura 11 - <i>S. capitis</i> em meio Vermelho de Congo negativo à produção de biofilme __	63
Figura 12 – <i>S. aureus</i> em meio Vermelho de Congo, positivo à produção de biofilme __	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Sensibilidade antibiótica de <i>S. pseudintermedius</i> _____	15
Tabela 2 – Agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de piodermatites e respectivas doses recomendadas _____	17
Tabela 3 - Susceptibilidade de bactérias de vida livre e biofilme a determinados agentes antimicrobianos _____	39
Tabela 4 – Animais pertencentes ao Grupo 1 _____	45
Tabela 5 – Animais pertencentes ao Grupo 2 _____	46
Tabela 6 – Critérios interpretativos dos antimicrobianos utilizados _____	52
Tabela 7 – Principais isolados bacterianos de animais do Grupo 1 _____	55
Tabela 8 - Principais isolados bacterianos de animais do Grupo 2 _____	56
Tabela 9 - Espécies de <i>Staphylococcus</i> identificadas em animais do Grupo 1 _____	57
Tabela 10 – Espécies de <i>Staphylococcus</i> identificadas em animais do Grupo 2 _____	58
Tabela 11 – Perfil de susceptibilidade staphylococci isolados dos animais do Grupo 1_	60
Tabela 12 – Perfil de susceptibilidade staphylococci isolados dos animais do Grupo 2_	61
Tabela 13 - Capacidade de produção de biofilme por staphylococci isolados de animais do Grupo 1 _____	62
Tabela 14 – Capacidade de produção de biofilme por staphylococci isolados de animais do Grupo 2 _____	64
Tabela 15 – Capacidade de produção de biofilme e respectivas resistências: Grupo 1_	65
Tabela 16 – Capacidade de produção de biofilme e respectivas resistências: Grupo 2_	65
Tabela 17 – Correlação entre a produção de biofilme e as resistências a antibióticos _	66

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Isolados bacterianos dos animais do Grupo 1 (percentagem) _____	56
Gráfico 2 - Isolados bacterianos de animais do Grupo 2 (percentagem) _____	57
Gráfico 3 - Espécies de <i>Staphylococcus</i> identificadas em animais do grupo 1 (percentagem) _____	58
Gráfico 4 - Espécies de <i>Staphylococcus</i> identificadas em animais do grupo 2 (percentagem) _____	59
Gráfico 5 – Nº de isolados de animais do Grupo 1 resistentes aos vários quimioterápicos testados _____	60
Gráfico 6 – Nº de isolados de animais do Grupo 2 resistentes aos vários quimioterápicos testados _____	61
Gráfico 7 – Nº de isolados produtores de biofilme nos animais dos Grupos 1 e 2 _____	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AHLs	Lactonas acil-hemoserinas
AIPs	Péptidos autoindutores
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
<i>Bap</i>	Biofilm-associated proteins
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
bid	Duas vezes ao dia
BSAVA	British small animal veterinary association
C	Cloranfenicol
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Cefalexina
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CN	Gentamicina
COS	Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENR	Enrofloxacina
F	Fêmea
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
HVR	Hospital Veterinário do Restelo
I	Intermédio
IgG	Imunoglobulina G
M	Macho
MCK	Agar Mac Conckey
MH	Mueller-Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina-resistente
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> metilicina-resistente
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NA	Ácido nalidíxico
ns	Não significativo
OVH	Ovariohisterectomia

P	Penicilina G
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PIA	Adesina intercelular polissacarídica
PIF	Peritonite infecciosa felina
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
P-V	Leucocidina Panton-Valentine
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
ST	Estreptomicina
S	Sensível
s	Significativo
sid	Uma vez ao dia
SIET	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> exfoliatine toxine
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprim
TE	Tetraciclina
tid	Três vezes ao dia
TSA	Teste de susceptibilidade antibiótica
UTL	Universidade Técnica de Lisboa
UV	Ultra violeta

NOTA PRÉVIA

O tema desta Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, “Produção de biofilme em staphylococci isolados da pele de canídeos”, foi escolhido porque o trabalho laboratorial sempre nos fascinou e queríamos desenvolver os nossos conhecimentos na área, mas sem deixar de parte o nosso outro grande interesse - a clínica dos animais de companhia. Assim, o estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), sob orientação da Dra. Maria João Fonseca, onde tivemos oportunidade de viver o dia-a-dia de um grande hospital veterinário, desenvolver os nossos conhecimentos nas áreas de medicina interna, cirurgia, imagiologia e várias especialidades, entre as quais a dermatologia (muito importante para o tema abordado neste trabalho), e recolher as amostras utilizadas no estudo. Foram recolhidas 31 amostras de superfície cutânea, divididas em 2 grupos. Do primeiro grupo fazem parte 20 amostras de cães sem qualquer doença dermatológica, e do segundo grupo 11 cães que apresentavam dermatite à data da consulta. Estas amostras foram posteriormente levadas para o Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL), onde foram analisadas.

O estudo teve como objectivos principais avaliar a capacidade de produção de biofilme de staphylococci isolados da superfície cutânea de cães, com e sem dermatite, e relacioná-la com a sua resistência a vários agentes antimicrobianos.

Este trabalho encontra-se assim dividido em duas partes que englobam uma breve descrição do estágio realizado no HVR, e a apresentação do trabalho laboratorial, antecedido por uma revisão bibliográfica sobre o tema.

BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DO RESTELO

O estágio curricular de mestrado integrado foi realizado no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), hospital de referência na área da grande Lisboa e do país, sob orientação da Dra. Maria João Fonseca. Decorreu no período entre 13 de Setembro de 2010 e 20 de Março de 2011, englobando turnos diurnos, nocturnos, fins-de-semana e feriados, totalizando cerca de 40 horas semanais. Isto excede largamente as 500 horas mínimas obrigatórias, sendo sensivelmente o dobro (1040h). A estas somam-se ainda as cerca de 100h no laboratório de microbiologia da FMV, ocupadas com o trabalho laboratorial que constitui a base para a parte prática desta dissertação.

O estágio no HVR permitiu-nos acompanhar os médicos veterinários e participar activamente em diversas áreas, nomeadamente consultas de medicina interna, de especialidade (dermatologia, ortopedia, neurologia, oftalmologia, cardiologia), cirurgia, internamento, imagiologia e laboratório.

Nas consultas foi-nos permitido observar e posteriormente realizar a anamnese, o exame clínico de estado geral, vários testes complementares de diagnóstico (hemograma, análises bioquímicas gerais) e pequenos procedimentos como pensos, administração de vacinas, colocação de catéteres e recolha de sangue, para além de acompanhar todo o processo de diagnóstico e terapêutica administrada pelos médicos veterinários.

Na área da cirurgia foi-nos permitido participar activamente em várias, exercendo o papel de 2º cirurgião, anestesista, instrumentista ou circulante, além de ter realizado exames pré e pós cirúrgicos. A casuística seguida foi diversa, tendo sido abordada a cirurgia geral (ovaríohisterectomia (OVH), orquidectomia, gastrotomia, gastropexia, enterotomia, enterectomia, esplenectomia, omentização de quistos prostáticos, mastectomia), ortopedia (maioritariamente fracturas, mas também displasia da anca e do cotovelo), neurologia (hérnias discais e tumores) e oftalmologia.

O internamento no HVR está dividido em áreas para cães, gatos, animais exóticos e animais com doenças infecto-contagiosas. Neste campo foi possível participar em todas as actividades realizadas, tais como acompanhamento e monitorização clínicas, administração de medicação, mudança de pensos, colocação de catéteres, algaliação, entre outras.

Em imagiologia foi-nos permitido realizar e/ou auxiliar na radiologia, ecografia, ecocardiografia e tomografia, bem como acompanhar a interpretação das várias imagens.

Já no laboratório foi possível realizar análises sanguíneas (hemogramas, bioquímicas gerais, bioquímicas específicas e ionogramas), análises urinárias, observar esfregaços sanguíneos e várias citologias, além de fazer requisições para análises a realizar em laboratórios externos, sempre que necessário.

Quanto à casuística observada, a grande maioria dos pacientes presentes à consulta são cães e gatos, embora tenhamos tido a oportunidade de acompanhar várias espécies de novos animais de companhia tais como coelhos, chinchilas, papagaios, periquitos, canários, tartarugas, iguanas, hamsters, caturras, entre outros.

Os gatos acompanhados sofriam maioritariamente de doenças renais, tais como insuficiências renais, aguda e crónica, traumatismos vários e tumores. Já nos cães, o leque de doenças era mais vasto, mas encontraram-se com bastante frequência gastroenterites, insuficiências cardíacas, tumores, doenças endócrinas, bem como várias afecções músculo-esqueléticas.

Em relação às doenças infecto-contagiosas, observaram-se em pacientes felinos maioritariamente vírus da imunodeficiência felina (FIV) e peritonite infecciosa felina (PIF), enquanto nos cães as doenças infecto-contagiosas mais frequentes foram a parvovirose e a leptospirose.

O Hospital Veterinário do Restelo está aberto 24 horas por dia, tendo-nos assim dado a oportunidade de acompanhar vários casos de urgência, com predominância para atropelamentos, torções gástricas e intoxicações. Além disso, e por ser um hospital de referência, tivemos a possibilidade de assistir a doenças relativamente raras e a vários desafios de diagnóstico e tratamento.

A experiência foi muito positiva, tendo-nos dado uma visão global de todas as áreas da clínica de animais de companhia, graças aos excelentes profissionais que lá exercem.

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCI ISOLADOS DA PELE DE CANÍDEOS

CAPÍTULO 1:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A pele do cão

1.1. Descrição geral da estrutura e funções da pele

A pele recobre a superfície corporal do cão e é constituída por duas camadas - a epiderme e a derme. Em contiguidade, encontramos a hipoderme, responsável pela ligação da pele com os tecidos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 2004; Locke & Harvey, 1992).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, formado maioritariamente por queratinócitos, mas também por melanócitos (células produtoras de melanina), células de Langerhans (envolvidas na resposta imunológica local através da apresentação de antígenos) e células de Merkel (células mecano-receptoras responsáveis pela sensibilidade tátil). Apresentando espessura variável ao longo do corpo, a epiderme pode ser constituída por até 5 camadas nas zonas mais espessas:

- Camada basal – caracterizada por um elevado índice mitótico e responsável, juntamente com a camada seguinte, pela renovação constante da epiderme.
- Camada espinhosa – função equivalente à camada anterior.
- Camada granulosa – responsável pela impermeabilização da pele, prevenindo assim a desidratação do organismo.
- Camada lúcida – camada fina e transparente limitada a regiões onde a pele é muito espessa, tais como as extremidades podais dos carnívoros.
- Camada córnea - tem espessura muito variável e é formada por células mortas, sem núcleo e cujo citoplasma está repleto de queratina.

A epiderme é submetida constantemente a diferentes agressões físicas, químicas e microbiológicas, das quais se protege através de diversos mecanismos de defesa que incluem: os pêlos que a recobrem, as células queratinizadas do estrato córneo, a descamação epitelial, o suor e as glândulas sebáceas (Junqueira & Carneiro, 2004; Locke & Harvey, 1992; William & Linda, 2005).

A derme é formada por tecido conjuntivo de espessura variável (dependendo da zona do corpo) e é constituída por duas camadas de limites pouco distintos - a camada papilar e a camada reticular. A primeira é formada por tecido conjuntivo frouxo, é responsável pela ligação da derme à epiderme através de fibrilhas de colagénio e forma as papilas dérmicas. A camada reticular, mais interna, é mais espessa e é constituída por tecido conjuntivo denso. É na derme que se encontra toda a irrigação sanguínea e linfática da pele, os nervos, bem como os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. É esta camada que dá suporte à epiderme, sendo responsável por todo o seu aporte vascular e nervoso (Junqueira & Carneiro, 2004).

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo e é rica em adipócitos. É a camada responsável pela adesão da derme aos tecidos adjacentes e, dependendo da região do

corpo e do estado de nutrição, pode formar o panículo adiposo, importante como reserva de energia e protecção contra o frio, para além de dar forma ao corpo (Junqueira & Carneiro, 2004; Locke & Harvey, 1992; William & Linda, 2005).

A pele desempenha múltiplas funções das quais importa destacar a termorregulação, a protecção contra a desidratação, a recepção de estímulos ambientais, protecção contra as radiações ultra-violeta e destoxificação por excreção de substâncias indesejáveis, entre muitas outras (Junqueira & Carneiro, 2004; Mejia, 2002; William & Linda, 2005; Paterson, 2008).

1.2. A microbiota cutânea

A superfície cutânea é o habitat natural de microbiota muito diversificada, que sobrevive e prolifera na pele sem provocar qualquer sinal de doença, desde que esteja em equilíbrio com o hospedeiro. É, no entanto, constantemente exposta e agredida por uma vasta variedade de microrganismos potencialmente patogénicos provenientes do ambiente, de outros animais, dos proprietários ou das próprias excreções. Para se proteger, a pele possui vários mecanismos de defesa físicos, químicos, imunológicos e microbiológicos (Scott, Miller & Griffin, 1997).

Numa primeira linha encontramos a defesa física, constituída pelas características da camada córnea que, através das suas células queratinizadas, densas e hermeticamente aglomeradas, impregnadas de gordura e suor, formam uma barreira difícil de penetrar. Esta mesma emulsão de gordura e suor (denominada sebo) é também um constituinte importante da defesa química. Os ácidos gordos (principalmente o ácido linoleico) têm propriedades antimicrobianas potentes, enquanto as substâncias hidrossolúveis presentes na emulsão (sais inorgânicos e proteínas) inibem o crescimento bacteriano (Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

Outra linha de defesa muito importante é a imunológica, constituída pelas células de Langerhans, os dendrócitos, os queratinócitos, os linfócitos T, entre outras, bem como por diversas citocinas, componentes do sistema complemento e imunoglobulinas. Este sistema desempenha um papel activo na indução e manutenção das respostas do sistema imunológico e apresenta propriedades antimicrobianas (Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

A microbiota normal da pele, constituída principalmente por bactérias e fungos, também contribui para a integridade cutânea. As bactérias localizam-se, predominantemente, à superfície da pele ou nos folículos pilosos, onde as glândulas sebáceas e sudoríparas lhes aportam nutrientes. A microbiota normal é mista e dinâmica, sendo influenciada pelo microambiente cutâneo. Os níveis de pH, a salinidade, a temperatura, a humidade, a quantidade de albumina e a quantidade de ácidos gordos presentes são factores importantes que podem favorecer determinados microrganismos em detrimento de outros.

Em situações extremas isto pode tornar-se problemático, uma vez que pode ocorrer o crescimento excessivo de determinado género fúngico ou bacteriano, o que pode desequilibrar toda a microbiota e dar lugar a possíveis infecções. No entanto, uma vez estabelecida, a microbiota costuma manter-se estável (Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

A estreita relação existente entre o hospedeiro e a sua microbiota faz com que esta iniba a colonização por microrganismos invasores, uma vez que ocupa os nichos microbiológicos existentes. Além disso, alguns representantes dos géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* são capazes de produzir bacteriocinas, substâncias que inibem o desenvolvimento de outras espécies bacterianas (Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

As bactérias isoladas da pele saudável podem ser classificadas como residentes ou transitórias, em função da capacidade, ou não, de se multiplicarem nesse habitat. A concentração de bactérias residentes tende a diferir bastante entre indivíduos mas permanece mais ou menos constante no indivíduo, excepto se afectada por algum tipo de tratamento antimicrobiano ou alterações climáticas. Por sua vez, as bactérias transitórias podem isolar-se a partir da pele mas são pouco relevantes, a menos que participem como invasores secundários num processo patológico. Não se multiplicam sobre a pele sã na maioria dos animais (Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

Segundo Scott et al. (1997), Krogh e Kristenses (1976) e Paterson (2008), os microrganismos residentes e transitórios no caso particular do cão são:

- Bactérias residentes: *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase-negativos (especialmente *S. epidermidis* e *S. xylosus*), *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Acinetobacter* spp., *Clostridium* spp. e *Corynebacterium* spp.
- Bactérias transitórias: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp.
- Fungos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. terrestre*.

Recentemente foi introduzida por alguns autores uma terceira categoria de bactérias denominadas nómadas, cujo comportamento apresenta características comuns às residentes e às transitórias. Estas bactérias têm uma grande capacidade para se aproveitar das mudanças do microambiente cutâneo, proliferando com frequência quer à superfície, quer mais profundamente na pele. Os staphylococci coagulase-positivos são os microrganismos que melhor se enquadram nesta categoria, com especial relevância para *S. pseudintermedius* no caso particular do cão (Scott et al., 1997; Locke & Harvey, 1992; Paterson, 2008).

2. Dermatite bacteriana canina

2.1. Conceito

A dermatite bacteriana canina – piodermatite - é uma infecção bacteriana da pele que, regra geral, envolve também os folículos pilosos. É uma afecção muito frequente no cão, mais ou menos pruriginosa, e constitui um dos principais estímulos iatrotópicos na área da dermatologia. Deve ser considerada como diagnóstico diferencial em qualquer dermatose canina (Jasmin, 2005).

Para ocorrer uma piodermatite primária é necessário ocorrer em simultâneo a proliferação de bactérias patogénicas e o estabelecimento de factores que permitem o seu desenvolvimento e penetração ao longo da espessura da pele (Scott et al., 1997).

Na grande maioria dos casos (cerca de 80%) as infecções bacterianas cutâneas são secundárias a outras afecções, sendo o diagnóstico e tratamento da doença subjacente fundamentais para controlar a infecção, restabelecer o ecossistema cutâneo e prevenir recidivas (Scott et al., 1997).

É muito importante distinguir as piodermatites superficiais das piodermatites profundas uma vez que a abordagem terapêutica e o prognóstico são bastante distintos (Paterson, 2008).

2.2. Etiologia

São inúmeras as espécies bacterianas possivelmente envolvidas nas piodermatites caninas. Importa fazer, numa primeira fase, a distinção entre agentes patogénicos primários – os staphylococci – que são a principal causa destas dermatites no cão, e os agentes patogénicos secundários, cuja multiplicação, sempre patológica, vem complicar a infecção causada pelos primeiros. São exemplos destes agentes patogénicos secundários *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli* (Scott et al., 1997).

No cão, mais de 90% dos agentes patogénicos primários isolados são *Staphylococcus pseudintermedius*. Esta bactéria, reside normalmente nas mucosas anal, bucal e nasal dos cães, de onde é transportada passivamente através da saliva para o pêlo e pele do animal, aproveitando-se de desequilíbrios no ecossistema cutâneo. A maioria dos autores classificam este microrganismo como transitório nómada, não sendo por isso, em condições normais, capaz de se estabelecer e multiplicar na pele desta espécie. É, no entanto, importante salientar que alguns cães são portadores assintomáticos desta bactéria, tal como ocorre com *Staphylococcus aureus* no Homem (Jasmin, 2005; Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

Além de *Staphylococcus pseudintermedius*, outros staphylococci coagulase positivos e negativos (*S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*,

S. xylosus, *S. hominis*, *S. capitis* e *S. simulans*) podem também estar ocasionalmente envolvidos (Noli, 2003; Hauschild & Wójcik, 2007).

2.3. Classificação

As dermatites bacterianas podem ser classificadas como primárias ou secundárias e como superficiais ou profundas (Scott et al., 1997).

As infecções primárias são estafilocócicas na sua grande maioria, e resolúveis com antibioterapia adequada. Por sua vez as infecções bacterianas secundárias, muito mais comuns, provêm de alterações cutâneas, metabólicas ou imunológicas previamente existentes, podem ser provocadas por microrganismos que não staphylococci e não respondem ao tratamento ou fazem-no lentamente, se o problema subjacente for ignorado. São recorrentes, a menos que se resolva a causa primária (Noli, 2003; Jasmin, 2005).

É bastante comum encontrar um cão com dermatite bacteriana secundária que não demonstra sinais clínicos de uma afecção subjacente, uma vez que, muitas vezes, esta está encoberta. Segundo Scott et al. (1997), as dermatites que se resolvem sem uma dermatose residual e que não recorrem com regularidade ou num período razoável (3 a 6 meses), podem considerar-se primárias.

As piodermatites superficiais são infecções bacterianas que afectam a epiderme e o epitélio folicular. Englobam o impetigo, a piodermite mucocutânea e a foliculite bacteriana superficial (Scott et al., 1997; Noli, 2003; Jasmin, 2005; Paterson, 2008).

Já as piodermatites profundas são infecções bacterianas graves, que afectam tecidos mais internos que o folículo piloso. Invadem a derme e muitas vezes o tecido subcutâneo, podendo mesmo provocar sinais sistémicos. Não são espontâneas nos cães e gatos normais, havendo sempre uma causa predisponente que é imperativo identificar para se conseguir um tratamento satisfatório (Scott et. al, 1997; Noli, 2003; Jasmin, 2005; Paterson, 2008).

Quando a infecção é localizada numa área pequena do corpo do animal, é mais provável a causa ser um trauma externo como, por exemplo, uma mordedura, um corpo estranho ou uma laceração. Quando as lesões são disseminadas, afectando toda uma zona corporal, ou generalizadas, o doente apresenta uma doença subjacente que deve ser identificada (Scott et al., 1997; Paterson, 2008).

As infecções cutâneas profundas são, geralmente, a continuação de uma infecção ou foliculite superficiais. A infecção vai-se aprofundando nos folículos e rompe a parede folicular, causando uma furunculose ou infectando a derme e o tecido subcutâneo, onde causa celulite e paniculite (Scott et al., 1997).

2.4. Factores de risco

Praticamente qualquer problema dermatológico pode predispor a uma dermatite bacteriana secundária, mas os processos alérgicos, seborreicos e foliculares são as causas mais prevalentes. Curiosamente em processos auto-imunes é raro haver infecção, provavelmente devido à presença de níveis altos de citocinas, que têm propriedades antimicrobianas (Scott et al., 1997).

Os cães alérgicos são particularmente propícios a infecções, geralmente superficiais, devido à automutilação provocada pelo prurido, à imunossupressão causada pelos corticoesteróides normalmente prescritos e possivelmente devido à presença de algumas disfunções imunológicas (Jasmin, 2005).

Os animais seborreicos têm na sua superfície cutânea uma carga microbiana muito elevada, geralmente estafilocócica, que coloniza facilmente um defeito epidérmico ou folicular, provocando uma infecção (Scott et al., 1997).

Qualquer inflamação, obstrução ou degeneração folicular predispõe para a foliculite. As causas de inflamação são numerosas, mas a demodecose e a dermatofitose são as mais relevantes. A obstrução folicular surge como consequência da seborreia generalizada, nos processos seborreicos focais, na adenite sebácea, nas displasias foliculares bem como em outros distúrbios foliculares congénitos. Já a degeneração folicular pode ser causada por todas as afecções anteriormente enumeradas, bem como pela alopecia areata (Scott et al., 1997).

Doenças metabólicas também podem provocar piodermatites secundárias, sendo as mais comuns o hipotireoidismo e o hiperadrenocorticism (iatrogénico ou espontâneo), embora a diabetes mellitus e outras alterações metabólicas sistémicas (hipercalcémia) também devam ser consideradas. Estas afecções predispõem a infecção, geralmente profunda, devido ao seu impacto no sistema imunológico e às alterações que provocam a nível do folículo piloso (Scott et al., 1997).

As imunodeficiências são outra das causas que mais predispõem a dermatites bacterianas secundárias e podem ser classificadas como primárias (congénitas e quase sempre hereditárias) ou adquiridas. No caso das primárias, os animais apresentam sinais de infecção em idades muito jovens, sem qualquer motivo aparente, enquanto as adquiridas são complicações habituais de muitas doenças sistémicas (Scott et al., 1997; Jasmin, 2005).

2.5. Fisiopatologia

Como anteriormente referido é *Staphylococcus pseudintermedius* o principal responsável pelas dermatites primárias no cão. Existe muita especulação sobre as razões pelas quais apenas um pequeno número de microrganismos é capaz de colonizar ou infectar a pele,

sabendo-se actualmente que a adesão bacteriana é um pré-requisito indispensável para a sua ocorrência. A adesão bacteriana correlaciona-se com a virulência do agente, o tropismo tissular e a susceptibilidade do hospedeiro (Scott et al., 1997; Jasmin, 2005; Paterson, 2008).

As linhagens de *S. pseudintermedius* isoladas de piodermatites caninas possuem moléculas de adesão à fibronectina, à vitronectina, ao colagénio e à lactoferrina além de serem produtoras de “clumping-factor” – receptor específico para o fibrinogénio, ligando-se assim ao hospedeiro. Além disso, podem produzir polissacarídeos que inibem a fagocitose. Acredita-se que a proteína A produzida por *S. aureus*, capaz de se ligar ao fragmento Fc da imunoglobulina G, impedindo a opsonização, possa desempenhar o mesmo papel nos cães infectados por *S. pseudintermedius* (Gomes, 2011; Scott et al., 1997). Este microrganismo é ainda produtor de várias toxinas, nomeadamente uma exfoliatina específica – *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliatine toxine (SIET) – que provoca eritema e deslocamento intra-dérmico (Terauchi, Sato, Endo, Aizawa & Maehara, 2003), leucocidinas com forte actividade lítica sobre os granulócitos e toxina beta, responsável pela hemólise (Gomes, 2011; Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 1999).

Outros microrganismos transitórios podem ser patogénicos em situações raras. As bactérias de Gram negativo têm tendência a multiplicar-se nas zonas húmidas e quentes e predominam quando a microbiota de Gram positivo se encontra diminuída. As bactérias anaeróbias predominam nas secreções gastrointestinais, pelo que a contaminação fecal parece ser o mecanismo predominante de infecção cutânea por esses microrganismos (Scott et al., 1997).

Em pacientes com diferentes dermatites (dermatite atópica, dermatite seborreica) encontra-se aumentado o número de bactérias residentes, não apenas nas áreas afectadas mas em toda a superfície corporal do animal. Comparados com animais normais, apresentam um crescimento mais abundante de microrganismos aeróbios, um maior número de áreas corporais que albergam staphylococci coagulase-positivos, e um número maior de bactérias de Gram negativo. Assim, estes animais contêm densas concentrações de bactérias potencialmente patogénicas, situação que deve ser tomada em consideração, quando se inicia a terapêutica (Scott et al., 1997; Jasmin, 2005).

2.6. Diagnóstico

Para realizar um diagnóstico correcto de uma dermatite bacteriana deve-se, como em qualquer doença, realizar primeiro um exame físico completo, incluindo avaliação da temperatura, auscultação e palpação abdominal (Hill, 2002; Paterson, 2008).

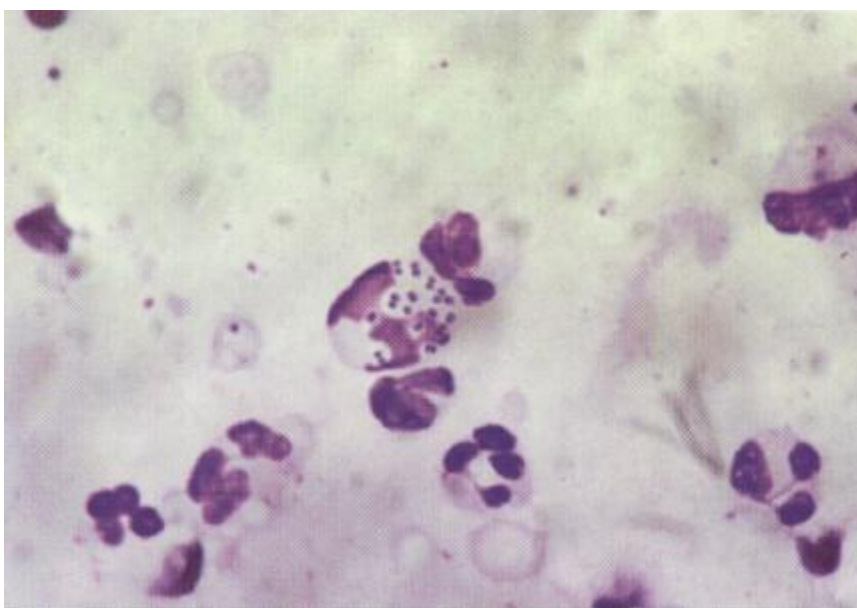
Antes de analisar as lesões dermatológicas individuais deve-se observar toda a superfície cutânea do animal à distância, para avaliar a sua extensão e padrões de distribuição.

Posteriormente, deve-se inspeccionar todas as lesões meticulosamente, investigando todo o corpo do animal. A identificação das lesões primárias (pápulas e pústulas) e secundárias (colaretes epidérmicos e crostas) e as suas características macroscópicas são essenciais para um bom diagnóstico dermatológico (Hill, 2002; Scott et al., 1997).

Sempre que se suspeita de uma dermatite bacteriana (presença de pápulas, pústulas, úlceras, erosões), deve-se realizar uma citologia, método laboratorial de eleição para o seu diagnóstico definitivo (Horvath & Neuber, 2007; Hill, 2002; Scott et al., 1997).

A citologia faz-se preferencialmente com material proveniente de lesões primárias intactas ou colhido através de raspagem cutânea das lesões, corado pelos métodos de Gram, Giemsa, Wright ou Diff Quik. A presença de cocos de Gram positivo (e/ou bacilos nalgumas situações), intra e extracelulares, bem como neutrófilos degenerados (Figura 1) são fortemente indicativos de piodermatite (Horvath & Neuber, 2007; Hill, 2002; Scott et al., 1997).

Figura 1 - *Staphylococcus pseudintermedius* no interior de um neutrófilo - fagocitose
(Adaptado de: Jasmin, 2005)



Em casos recorrentes ou quando a citologia mostra um predomínio de bacilos nas lesões, deve-se realizar uma cultura e respectivo teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos (TSA) para uma melhor escolha terapêutica. Já em casos de piodermatites crónicas (presença de macrófagos e plasmócitos) pode ser necessário recorrer a uma biopsia cutânea (Horvath & Neuber, 2007; Scott et al., 1997).

É muito importante não esquecer que a maioria das dermatites bacterianas é secundária a outra afecção, sendo fundamental a sua identificação e tratamento. Apenas quando a doença subjacente for correctamente diagnosticada e controlada é que podemos evitar recidivas (Paterson, 2008; Jasmin, 2005; Scott et al., 1997).

2.7. Tratamento

O tratamento satisfatório de uma dermatite requer que a causa subjacente seja identificada e corrigida e que o processo infeccioso receba a terapêutica conveniente. A infecção bacteriana pode ser resolvida com tratamento tópico, sistémico, cirúrgico ou uma combinação entre os anteriores, dependendo de cada caso específico (Scott et al., 1997).

A maioria das piodermatites na espécie canina são demasiado extensas para serem resolvidas apenas com tratamento tópico, mas o mesmo é muito importante como adjuvante, uma vez que acelera a recuperação, não tendo consequências negativas para o paciente (Jasmin, 2005; Horvath & Neuber, 2007).

O tratamento tópico tem como objectivo remover os detritos celulares presentes à superfície das lesões, reduzir ou eliminar a população bacteriana das lesões e em seu redor, bem como estimular a drenagem das mesmas. Os agentes mais utilizados são a clorexidina, a iodopovidona, o hexaclorofeno, o etil lactato e o peróxido de benzoilo, sob a forma de champôs, géis, soluções de limpeza e cremes (Jasmin, 2005; Horvath & Neuber, 2007; Scott et al., 1997).

O tratamento cirúrgico pode ser utilizado em lesões focais removendo toda a área afectada ou como complemento aos outros tratamentos. O maneio deve ser individualizado e varia muito consoante as lesões, animal e proprietário em causa (Scott et al., 1997).

Quanto ao tratamento sistémico, já foram efectuados múltiplos estudos sobre a sensibilidade antibiótica de *S. pseudintermedius* no cão (Tabela 1).

Tabela 1 - Sensibilidade antibiótica de *S. pseudintermedius* (adaptado de Scott et al., 1997)

Excelente (>90%)	Boa (70-90%)	Má (<50%)
Amoxicilina + Ac. clavulânico Cefalosporinas	Cloranfenicol Eritromicina Lincomicina Sulfatiazina potenciada	Penicilina Ampicilina Tetraciclina

Para uma infecção estafilocócica sem tratamento prévio, a selecção do antibiótico pode ser empírica ou baseada nos resultados de uma cultura com teste de sensibilidade a agentes quimioterapêuticos. Os autores recomendam o tratamento empírico para todos os animais que não foram previamente medicados, a menos que o paciente apresente reacções adversas aos fármacos rotineiramente utilizados ou nos casos de tratamento prolongado (mais de 21 dias) sem resultados satisfatórios.

Dos fármacos disponíveis, os que reúnem maior consenso entre os autores consultados no tratamento de piodermatites estafilocócicas são a amoxicilina associada ao ácido

clavulânico, as cefalosporinas (principalmente as de 1ª geração como a cefalexina), as sulfonamidas potenciadas, os macrólidos e as lincosamidas (Jasmin, 2005; Horvath & Neuber, 2007; Scott et al., 1997; DeBoer, 2006; Locke & Harvey, 1992; May, 2006). Os aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas também são eficazes, mas devem ser utilizadas apenas na ausência de outras soluções terapêuticas (DeBoer, 2006; May, 2006). A penicilina, a ampicilina e a amoxicilina não são eficazes no seu tratamento, uma vez que são antibióticos sensíveis às beta-lactamases produzidos pela maioria dos isolados de *S. pseudintermedius* (Harvey & Hunter, 1999; May, 2006). A tetraciclina também não é recomendada, uma vez que a maioria dos estafilococos é resistente a este antibiótico (Scott et al., 1997; May, 2006; DeBoer, 2006).

Importa no entanto referir que nos últimos anos tem se verificado um acréscimo das resistências por parte de *S. pseudintermedius* a vários dos grupos antibióticos rotineiramente utilizados (Hauschild & Wójcik, 2007; Ganieère, Madaille & Magnion, 2005; Rubin, Ball & Chirino-Trejo, 2011).

Um estudo sobre a susceptibilidade antibiótica de *Staphylococcus pseudintermedius*, publicado em Fevereiro de 2011, utilizando 60 amostras caninas recolhidas entre 1986 e 2000 na Faculdade de Medicina Veterinária de Western, mostrou que a bactéria é susceptível aos agentes antimicrobianos mais frequentemente utilizados na prática clínica veterinária, incluindo amoxicilina associada ao ácido clavulânico, cefalotina e enrofloxacin. No entanto a penicilina, a eritromicina, a clindamicina e principalmente a tetraciclina não mostraram uma eficácia satisfatória, tendo percentagens de resistência entre 7% e 34% (Rubin et al. 2011).

Num outro estudo realizado em França por Ganieère e colaboradores (2005) foram analisadas 50 amostras de *S. pseudintermedius* isoladas de piodermatites tendo sido observada resistência às penicilinas sensíveis às beta-lactamases (62%), à oxitetraciclina (46%), à estreptomicina, neomicina e eritromicina (28%), à clindamicina (22%) e à gentamicina e fluorquinolonas (2%).

Um outro estudo publicado por Ahmati e colaboradores em 2008 demonstrou a presença de estafilococos patogénicos e multirresistentes na pele do cão. A partir de 100 cães clinicamente saudáveis foram isolados 79 estafilococos, dos quais 51 eram coagulase-positivos (64,55%). Todos eles apresentavam resistências à penicilina G, à amoxicilina, à cefazolina, à estreptomicina, à eritromicina, à ampicilina, à tetraciclina, à gentamicina, à enrofloxacin e ao trimetoprim-sulfatiazina em 100%, 100%, 72%, 48%, 44%, 44%, 12%, 4% e 8%, respectivamente.

Quanto às infecções recorrentes, a maioria dos estudos refere que os isolados com sensibilidade inicial excelente para determinados fármacos, estes mantêm a sua eficácia nas recorrências, enquanto a susceptibilidade aos restantes agentes antimicrobianos

diminui. Assim pode-se proceder à realização de um novo antibiograma ou seleccionar um dos fármacos para o qual a sensibilidade inicial era excelente (Scott et al., 1997).

Quando estamos perante uma infecção mista (demonstrada através de uma citologia ou cultura) é fundamental realizar um TSA. Se todos os microrganismos envolvidos na infecção forem sensíveis a um antibiótico seguro e razoavelmente económico, este deve ser prescrito. O problema é que, nalgumas situações, nenhum fármaco é eficaz contra todas as bactérias envolvidas ou então é muito tóxico ou dispendioso para ser utilizado como tratamento prolongado. Nestas situações, e se *Staphylococcus pseudintermedius* fizer parte das bactérias identificadas, como acontece na maioria dos casos, o tratamento deve ser direccionado para este microrganismo. Normalmente erradicar o agente patogénico primário torna o microambiente cutâneo desfavorável para as restantes bactérias envolvidas. Se isto não resolver a infecção, devem-se então explorar outras alternativas (Scott et al., 1997; Jasmin, 2005; Horvath & Neuber, 2007).

A maioria dos agentes antimicrobianos normalmente utilizados (Tabela 2) têm que ser administrados 2 a 3 vezes por dia, o que pode ser um problema para os proprietários menos disponíveis. Nestes casos, devem-se explorar alternativas, uma vez que a correcta administração do fármaco antimicrobiano é fundamental para o sucesso do tratamento (Scott et al., 1997).

Tabela 2 - Agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de piodermatites e respectivas doses recomendadas (Adaptado de Plumb, 2008)

Fármaco	Cefalexina	Amoxicilina + Ác. clav.	Enrofloxacin	Clindamicina	Lincomicina	Eritromicina	Trimetopim + Sulfa
Dose (mg/kg)	22-35 bid 22 tid	12,5 bid	2.5-5 bid 5 sid	11 sid	15,4 tid 22 bid	10-15 tid 15-25 bid	30 sid 15 bid

A causa mais comum de resultados insatisfatórios e de recidivas é a insuficiente duração da terapêutica. Normalmente o tratamento de uma piodermatite superficial deve-se prolongar cerca de 3-4 semanas, enquanto as piodermatites profundas necessitam de antibioterapia durante, pelo menos, 6 semanas. No entanto, cada caso tem características particulares, sendo por isso recomendável prolongar o tratamento pelo menos uma semana após a resolução dos sinais clínicos. Isto implica uma cicatrização completa de todas as lesões, quer superficiais, quer profundas. É necessário fazer revisões frequentes a estes animais durante o tratamento (Scott et al., 1997; Noli, 2003; Horvath & Neuber, 2007).

A utilização de corticoesteróides é contra-indicada. Estes, apesar de diminuírem marcadamente a inflamação e o prurido, dificultam o diagnóstico e tornam impossível avaliar a eficácia do tratamento antibiótico, uma vez que mascaram os sintomas inflamatórios. Além disso, o seu efeito imunossupressor favorece a manutenção ou mesmo a dispersão da

infecção. Se for necessário fazer um tratamento combinado de antibiótico e corticoesteróides (apenas em casos específicos como celulite juvenil), o último deve ser interrompido pelo menos sete dias antes da decisão de interromper o antibiótico (Scott et al., 1997; Horvath & Neuber, 2007; Jasmin, 2005).

As recidivas são muito frequentes nas infecções cutâneas, ou porque o processo não foi adequadamente tratado, ou porque a sua causa subjacente não foi correctamente identificada e resolvida. Se as lesões reaparecerem até 7 dias após a finalização do tratamento, é provável que a infecção não tenha sido resolvida. Se surgirem semanas ou meses depois da última terapêutica, o animal provavelmente apresenta um problema primário que deve ser controlado (Scott et al., 1997; Horvath & Neuber, 2007; Jasmin, 2005). A imunomodulação pode ser considerada em animais imunodeprimidos com infecções recorrentes crónicas. Este tratamento não resolve a infecção existente mas ajuda a prevenir o seu reaparecimento. Há estudos que demonstram que o levamisol e a cimetidina são agentes imunomodeladores bastante eficazes. Este tratamento pode ter benefícios em casos particulares, mas é importante ter em consideração que são agentes caros e não inócuos, devendo ser utilizados com precaução (Scott et al., 1997; Horvath & Neuber, 2007). Podem ainda utilizar-se vacinas estafilocócicas autógenas, que se preparam a partir de culturas isoladas da pele do próprio animal. Este tratamento tem mostrado resultados satisfatórios mas é necessários aprofundar a sua investigação (Scott et al., 1997; Horvath & Neuber, 2007).

3. **Staphylococcus spp.**

3.1. Taxonomia

Os staphylococci são bactérias de Gram positivo, catalase positivas, que juntamente com os géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Planococcus*, fazem parte da família *Micrococcaceae*. Têm entre 0,5 e 1,5 micrómetros de diâmetro, agrupando-se normalmente sob um padrão que se assemelha a um cacho de uva, embora se possam apresentar individualmente, em pares ou em cadeias curtas. São capazes de crescer em meios contendo alta concentração de NaCl (p.e.10%) e a temperaturas entre os 18 °C e os 40 °C. São microrganismos imóveis, não esporulados e tipicamente não capsulados. Na sua grande maioria são anaeróbios facultativos, com excepção de *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subs. *anaerobius* (Gomes, 2011; Murray, Rosenthal & Pfaller, 2006; Quinn, 1999).

Segundo Euzébi (2011) o género *Staphylococcus* é actualmente composto por 45 espécies e 24 subespécies.

3.2. O papel de staphylococci

3.2.1. Como bactéria residente

Bactérias do género *Staphylococcus* são ubiqüitários, sendo o seu principal habitat a pele e as mucosas de mamíferos e aves. Podem ser encontrados na boca, glândulas mamárias, intestinos, tracto genito-urinário e aparelho respiratório anterior. Geralmente são inócuos, tendo uma relação de simbiose com o hospedeiro, mas podem tornar-se patogénicos sempre que atravessarem a barreira cutânea, forem inoculados através de picadas ou directamente introduzidos juntamente com dispositivos médicos (por exemplo implantes e pace-makers) (Gomes, 2011; Murray et al., 2006; Quinn et al., 1999).

S. aureus é um dos principais microrganismos residentes na pele dos primatas, mas determinados biótipos desta espécie podem ser ocasionalmente isolados a partir de diferentes animais domésticos. *S. schleiferi*, *S. pseudintermedius* e *S. felis* são maioritariamente isolados a partir de carnívoros, enquanto *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. lentus* e *S. vitulus* são residentes normais dos ungulados (Murray et. al., 2006).

É importante ainda salientar que certas espécies de *Staphylococcus* têm preferências específicas por determinadas zonas do corpo do seu hospedeiro, uma vez que o microambiente influencia o seu crescimento. Um exemplo típico é *S. aureus*, que tem preferência pelas narinas do Homem como habitat (Quinn et al., 1999).

3.2.2. Como agente de infecção

A grande maioria das infecções estafilocócicas é oportunista e relaciona-se com traumas, imunossupressão, infecções fúngicas e parasitárias subjacentes, afecções alérgicas e distúrbios endócrinos ou metabólicos. Geralmente são provocadas por staphylococci coagulase positivos (*S. aureus* e *S. pseudintermedius*), embora estirpes de baixa virulência (coagulase-negativos) também sejam capazes de infectar os animais (Murray et al., 2006).

Staphylococcus aureus, agente etiológico mundialmente distribuído e com uma elevada prevalência em infecções nosocomiais, é responsável por uma grande variedade de doenças, desde infecções cutâneas relativamente benignas a doenças sistémicas potencialmente fatais (Yarwood, Bartels, Volper & Greenberg, 2004). As suas manifestações clínicas podem ser divididas em doenças mediadas por toxinas (intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico p.ex.), infecções da pele e tecidos moles (furunculose, impetigo, celulite), infecções de tecidos profundos (válvulas cardíacas, articulações, ossos) e infecções do pulmão e do tracto urinário. Encontramos ainda em ambiente hospitalar infecções de feridas cirúrgicas, pneumonias em doentes ventilados artificialmente, bacteriémia associada a dispositivos intravenosos (p.ex. cateteres) e infecções associadas a outros materiais protésicos. Estas bacteriémias são uma preocupação crescente na

medicina moderna uma vez que 2/3 estão associadas a infecções nosocomiais com uma crescente taxa de resistência à meticilina (MRSA) (Murray et al., 2006; Gomes, 2011; Quinn et al., 1999).

Por sua vez, *S. pseudintermedius* provoca inúmeras infecções no caso particular do cão, incluindo celulite, otite externa, piodermatites, abscessos, mastites, infecções do tracto urinário, entre outras (Murray et al., 2006). Reconhecido como uma espécie independente apenas desde 2005 (Devriese et al., 2005), os estudos referentes a *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) são escassos. Em 2009, Rusher, Lübke-Becker, Wleklinski, Soba, Wieler e Walter publicaram um estudo onde analisaram 16103 amostras recolhidas em clínicas de animais de companhia na Alemanha, obtendo uma prevalência de MRSP em pequenos animais de 0,58% (n=67). Estes resultados reflectem o recente perigo emergente das infecções por esses microrganismos, que além de potencialmente zoonóticos são muitas vezes multi-resistentes. Foi ainda demonstrado que a taxa de MRSP isolados a partir de feridas foi consideravelmente superior a todas as outras infecções.

O envolvimento de staphylococci coagulase-negativos em infecções nosocomiais também tem sido descrito nas últimas décadas, com especial relevância para *S. epidermidis*. Este microrganismo é responsável por inúmeras bacteriémias, endocardites, infecções de feridas cirúrgicas, infecções do tracto urinário, infecções relacionadas com cateteres endovenosos, entre outras, quer em cães, quer em humanos (Murray et al., 2006; May, 2006).

Uma vez que os staphylococci coagulase negativos têm muitas vezes resistências antimicrobianas múltiplas, o estudo da resistência à meticilina nestes microrganismos é também necessária. Um estudo de 2004 demonstrou a presença de *S. schleiferi* coagulase negativos meticilina resistentes isolados de piodermatites caninas (Kania, Williamson, Frank, Wilkes, Jones & Bemis, 2004).

3.3. Estrutura, Fisiologia e Patogenia

A patogenia das infecções por staphylococci depende da produção de proteínas de superfície, que medeiam a aderência da bactéria ao tecido do hospedeiro através da ligação a moléculas como o colagénio, fibronectina e fibrinogénio, elaborando posteriormente proteínas extracelulares como toxinas específicas e enzimas hidrolíticas (Gordon & Lowy, 2008). Virtualmente a produção de todas as toxinas, enzimas (proteases, lipases, nucleases) e proteínas de superfície de *S. aureus* são controlados pelo regulador de virulência *agr*. Este sistema medeia alterações na expressão genética quando se atinge determinada concentração bacteriana, através de um processo denominado quorum sensing (discutido mais a frente nesta dissertação). Esta adaptação permite que as bactérias produzam os produtos extracelulares quando estes são mais necessários: proteínas de

ligação no início da infecção, quando a densidade celular é baixa e a adesão ao tecido do hospedeiro é crucial, e toxinas e enzimas hidrolíticas, quando a infecção está estabelecida e são necessários nutrientes e a activação de mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro (Cheung, Wang, Khan, Sturdevant & Otto, 2011).

Geralmente os staphylococci não são capsulados, podendo no entanto alguns representantes do género, apresentar uma cápsula polissacarídica a cobrir a sua camada mais externa. Foram identificados 11 serotipos capsulares de *S. aureus*, sendo os serotipos 5 e 8 associados à maioria das infecções. Esta cápsula protege a bactéria, inibindo a fagocitose do microrganismo pelos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e a opsonização. As estirpes que não a possuem podem apresentar no seu lugar uma camada mucóide composta por monossacarídeos, proteínas e pequenos péptidos em quantidades variáveis, dependendo de factores genéticos e das condições de crescimento. Esta substância extracelular, denominada biofilme, possibilita a ligação da bactéria aos tecidos e materiais sintéticos (catéteres, enxertos, próteses) protegendo os microrganismos invasores das defesas do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos (Gordon & Lowy, 2008; Murray et al., 2006).

Por serem de Gram positivo, a parede celular dos estafilococos é formada essencialmente por peptidoglicano, que torna a célula mais rígida. O peptidoglicano estimula a produção de pirogénio endógeno, a activação do complemento, a produção de interleucina-1 pelos monócitos e a agregação de PMN, responsáveis pela formação de abscessos (Quinn et al., 1999; Murray et al., 2006).

A parede celular é ainda composta em 30-50% do seu peso por ácidos teicóicos específicos da espécie, ligados covalentemente à camada de peptidoglicano e, através de ligação lipofílica, à membrana citoplasmática (Murray et al., 2006). Os ácidos teicóicos medeiam a ligação dos estafilococos às membranas mucosas, através de uma ligação específica à fibronectina, estimulando ainda uma resposta de anticorpos, quando ligados ao peptidoglicano (Murray et al., 2006).

É importante ainda referir que a maioria das estirpes de *S. aureus* tem a sua superfície recoberta por proteína A, o que é um receptor da fracção Fc das imunoglobulinas IgG1, IgG3 e IgG4, podendo prevenir a opsonização. Isto faz com que a eliminação imunomediada por anticorpos do microrganismo seja comprometida (Gordon & Lowy, 2008; Murray et al., 2006; Gomes, 2011).

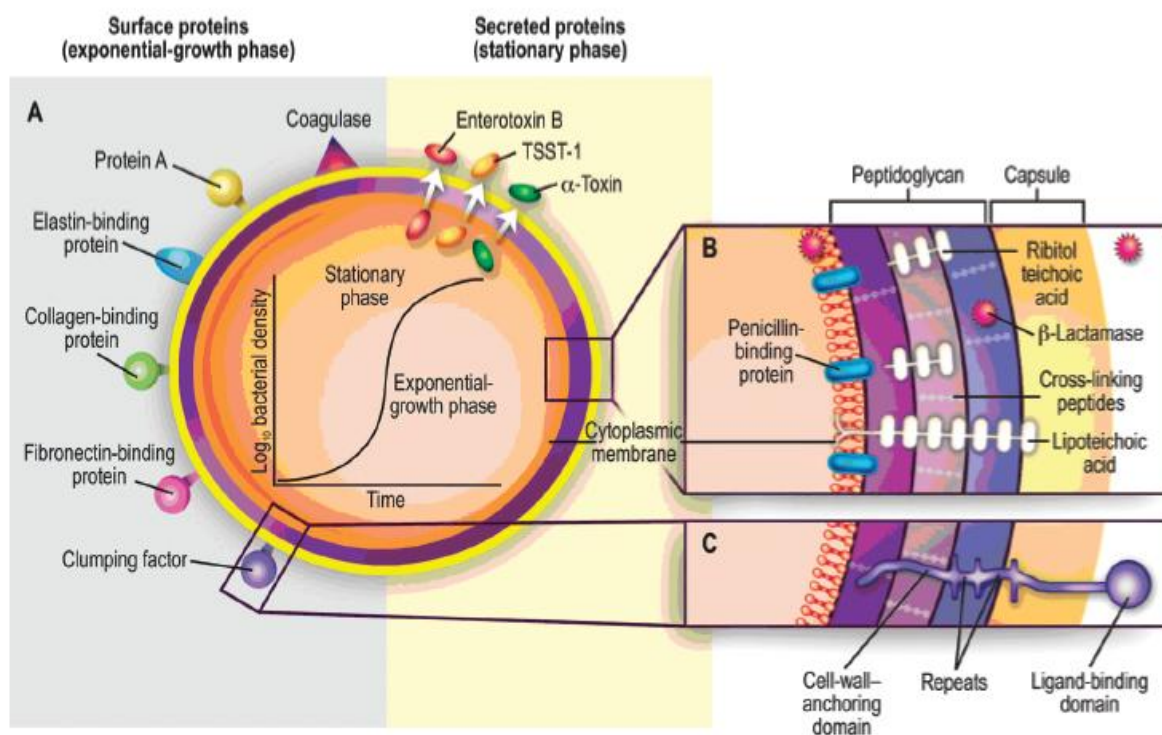
Além da proteína A, os estafilococos apresentam várias outras proteínas de superfície, como é o caso do factor “clumping” em *S. aureus*. Esta proteína é um factor de virulência importante deste microrganismo, uma vez que se liga ao fibrinogénio, convertendo-o em fibrina insolúvel, o que tem como consequência a agregação destas bactérias. Outras proteínas de superfície como a fibronectina, o fibrinogénio a elastina e o colagénio também

são importantes para a aderência do microrganismo aos tecidos do hospedeiro (Quinn et al., 1999; Gomes, 2011).

Finalmente temos a membrana citoplasmática, formada por um complexo de proteínas, lípidos e uma pequena quantidade de carboidratos, e que funciona como uma barreira osmótica para a célula bacteriana, fornecendo um ancoradouro para as enzimas celulares biossintéticas e respiratórias (Quinn et al., 1999; Murray et al., 2006).

S. aureus produz vários factores de virulência (Figura 2), incluindo cinco toxinas citolíticas que danificam a membrana (alfa, beta, delta, gama e leucocidina Pantón-Valentine (P-V), duas toxinas esfoliativas (A e B), oito enterotoxinas (A-E, G-I) e a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1). A leucocidina P-V tem sido relacionada com infecções cutâneas (Quinn et al., 1999; Murray et al., 2006; Gomes, 2011).

Figura 2 – Factores de virulência de *Staphylococcus aureus*
(Adaptado de Gordon & Lowy, 2008)



Como anteriormente referido, o género *Staphylococcus* possui inúmeros mecanismos causadores de doença e de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro. É importante, no entanto, notar que nem todas as estirpes são iguais, podendo expressar diferentes adesinas e toxinas e variar na sua capacidade de produzir biofilme e de se evadir às defesas do hospedeiro. A distribuição dos factores de virulência está relacionada com o tipo clonal e com a informação genética que possuem, sendo por isso imprevisíveis numa infecção (Gordon & Lowy, 2008).

3.4. Tratamento e Multirresistências

Os staphylococci resistentes à meticilina apresentam frequentemente co-resistências a outros fármacos antimicrobianos pertencentes a diferentes grupos terapêuticos, pelo que têm sido uma preocupação mundial crescente em medicina, tanto Humana como Veterinária, tendo sido fruto de várias investigações nos últimos anos.

O fenómeno de resistência a fármacos antimicrobianos deve-se à presença ou aquisição de genes que codificam enzimas que inactivam os agentes antimicrobianos (como é o caso da penicilinase para as penicilinas), modificam o alvo do antibiótico (modificação dos ribossomas e inactivação da eritromicina) ou codificam proteínas que não são sensíveis ao antibiótico (produção de uma DNA-girase não afectada pelas fluorquinolonas) (López & Camberos, 2006).

Há dois tipos de resistências bacterianas: resistências intrínsecas ou naturais e resistências adquiridas por mutação genética do DNA cromossómico bacteriano e/ou por aquisição de um plasmídeo de resistência transferível (Murray et al., 2006; López & Camberos, 2006).

A resistência intrínseca é inata e previsível. É uma característica estável de certas espécies bacterianas perante um antimicrobiano. A resistência cromossómica é menos frequente, espontânea e não é desencadeada pela utilização de agentes antimicrobianos (apenas posta em evidência pela mesma). Quanto à resistência plasmídica, um plasmídeo (fragmento de DNA extracromossómico), que dirige a síntese de enzimas que inactivam os antibióticos, é inserido no código genético da bactéria (por conjugação ou por transdução através de um bacteriófago). Esta transferência pode ocorrer entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes (Guaguère & Bensignor, 2004; López & Camberos, 2006).

Os staphylococci partilham o habitat com uma enorme variedade de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo na pele, mucosas e tracto respiratório dos mamíferos, sendo expostos a uma variedade imensa de informação genética. Os genes de resistência são assim facilmente adquiridos a partir deste ambiente altamente diversificado (Ahmati, Javadi & Maroofi, 2008).

Após introdução da penicilina, os staphylococci desenvolveram rapidamente resistência a este fármaco (actualmente menos de 10% das estirpes do género são susceptíveis). Esta resistência é mediada pela penicilinase, uma beta-lactamase específica para a penicilina, que hidrolisa o seu anel beta-lactâmico. A informação genética que codifica a produção desta enzima está presente em plasmídeos transmissíveis, os quais facilitam a rápida disseminação deste factor de virulência (Murray et al., 2006; López & Camberos, 2006).

Posteriormente foram desenvolvidas penicilinas semi-sintéticas resistentes à hidrólise pelas beta-lactamases como a meticilina, a nafcilina, a oxacilina e a dicloxacilina. No entanto a resistência a estes agentes antimicrobianos também se está a disseminar rapidamente

através da aquisição do gene *mecA*, que codifica uma nova proteína que se liga à penicilina, a PBP2, atingindo uma grande parte das estirpes de *S. aureus* e dos staphylococci coagulase-negativos. A expressão dessa proteína torna a bactéria resistente a todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos (Murray et al., 2006; López & Camberos, 2006). Staphylococci multirresistentes e meticilina-resistentes podem ser facilmente adquiridos pelo Homem por contacto directo com pessoas infectadas ou portadores, através do ambiente ou através do contacto directo com animais. O papel do cão como reservatório tem sido cada vez mais estudado, uma vez que a relação dos humanos com estes animais sofreu nos últimos anos uma evolução marcada (Ahmati et al., 2008). Guardabassi, Loeber e Jacobson (2004) evidenciaram que donos de cães afectados por piodermite profunda frequentemente possuem a mesma estirpe de *S. pseudintermedius* que os seus animais, e que estas bactérias podem ser resistentes a uma grande variedade de antimicrobianos. Isso é preocupante porque apesar de *S. pseudintermedius* raramente causar doença no homem (bactéria comensal da pele canina) existe um risco potencial de transferência de genes de resistência para staphylococci patogénicos do Homem (Guardabassi et al., 2004). Uma transferência horizontal de genes de resistência parece ocorrer entre *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, bem como entre *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativos (Ahmati et al., 2008).

Num estudo de 2010 publicado por Lucia et al. ficou demonstrada uma prevalência de 2% (n=10/590) de MRSP na espécie canina, com respectiva detecção do gene *mecA* através de PCR no seu genoma, números maiores que os verificados por Rusher et al. em 2009, onde a prevalência foi de 0,45%. Isto é particularmente grave, já que o 1º relato de MRSP na Europa é muito recente, tendo sido descrito por Loeffler e colaboradores em 2007.

Nos últimos 10 anos MRSA também emergiram como agentes patogénicos de infecções nos animais de companhia e têm sido uma preocupação crescente devido à sua importância como potenciais reservatórios e vectores de infecção para o Homem. Embora a sua incidência no cão permaneça desconhecida, variando entre regiões, MRSA são considerados agentes patogénicos pouco comuns nesta espécie (Loeffler & Lloyd, 2010). A maioria das infecções parece ser adquirida por contacto directo com humanos portadores e está associada a feridas cirúrgicas e animais imunodeprimidos, apesar de ter sido também descrita em infecções cutâneas em cães (Morris, Rook, Shofer & Rankin, 2006; Hauschild & Wójcik, 2007).

Vários estudos demonstram que a maioria das estirpes MRSA isoladas de cães e gatos são geneticamente indistinguíveis através de electroforese em campo pulsado (PFGE, Pulsed field gel electrophoresis) das que causam infecções hospitalares no Homem e que o mesmo padrão de resistência pode ser identificado em humanos e animais de companhia em convivência (Loeffler & Lloyd, 2010; Leonard & Markey, 2008).

Embora até à data não haja nenhum estudo específico publicado sobre a transmissão de MRSA entre humanos e animais de companhia, análises genéticas e inúmeros relatos de casos indicam fortemente que essa transmissão pode ocorrer nos dois sentidos (Loeffler & Lloyd, 2010). Pensa-se que primariamente a transmissão terá ocorrido a partir do Homem, através de pacientes infectados ou pessoal médico portador, até que eventualmente se tenha dado a transmissão inversa com origem nos animais de companhia. Animais portadores foram implicados como fontes e vectores de infecção humana recorrente (Loeffler & Lloyd, 2010; Leonard & Markey, 2008; Boost, O'Donoghue & Siu, 2007).

Um estudo publicado em 2011 por Couto, Pomba, Moodley e Guardabassi investigou a colonização nasal por MRSP e MRSA em 146 cães e 141 gatos hospitalizados no Hospital Veterinário da Universidade Técnica de Lisboa em Portugal e obteve uma prevalência de 7,1% (n=10) em cães e 1,4% (n=2) em gatos, dos quais 9 foram MRSP e 3 MRSA. MRSP foram identificados apenas em cães (6,2%), enquanto MRSA foram isolados de ambas as espécies, 2 gatos (1,4%) e um cão (0,7%). Os isolados MRSP foram resistentes a um maior número de agentes antimicrobianos que os MRSA. Os resultados obtidos sugerem que as estirpes MRSP estão em disseminação na Europa (1º relato em Portugal data de 2009), sendo um desafio terapêutico para os Médicos Veterinários.

É importante referir que as estirpes MRSA são geralmente heterorresistentes, isto é, dentro da mesma cultura coexistem dois grupos de bactérias, um susceptível aos antibióticos beta-lactâmicos, e outro resistente. Isto acontece porque, embora todas as bactérias possam ter o gene *mecA* no seu genoma, apenas uma pequena percentagem é capaz de o expressar *in vitro*. A fracção resistente cresce muito mais lentamente que a susceptível, o que pode fazer com que não seja detectada em testes laboratoriais (Murray et al., 2006).

Até recentemente, o único antibiótico que permanecia 100% eficaz contra os staphylococci era a vancomicina, tratamento de eleição para os MRSA. No entanto foram detectadas duas formas de resistência a este antibiótico por parte de *S. aureus*. Um baixo nível de resistência é observado em estirpes de *S. aureus* que apresentam uma parede celular mais espessa e mais desorganizada. Parece que a vancomicina é incapaz de alcançar a membrana citoplasmática, onde pode inibir a síntese de parede celular ficando aprisionado na sua matriz (Murray et al., 2006; Gomes, 2011). Outro mecanismo de resistência é mediado pelo gene *vanA*, adquirido a partir de enterococos resistentes à vancomicina. Estas bactérias têm uma camada de peptidoglicano à qual o antibiótico em causa se liga. Este tipo de resistência é extremamente raro mas é um perigo potencial elevadíssimo, se disseminado (Murray et al., 2006).

A proliferação de staphylococci multirresistentes e resistente à meticilina tornou o tratamento empírico das infecções cutâneas muito menos seguro, devendo-se realizar uma cultura e respectivo TSA sempre que a primeira abordagem empírica falhar, e não tentar o tratamento com outros agentes antimicrobianos como é prática comum. A ineficácia do tratamento com

antibióticos de primeira linha deve sugerir multirresistência (Morris et al., 2006; Griffeth, Morris, Abraham, Shofer & Rankin, 2008).

4. Biofilme

4.1. Definição

A primeira referência ao que hoje denominamos de biofilme remonta a 1933, quando Hierici evidenciou que a maior parte das bactérias aquáticas crescem sobre superfícies submersas e não flutuam livremente no meio aquático (O'Toole, Kaplan & Kolter, 2000).

A definição de biofilme tem evoluído nos últimos 35 anos. Em 1976 Marshall descreveu a presença de fibrilhas extracelulares, que prendiam as bactérias às superfícies. Em 1987 Costerton et al. afirmaram que os biofilmes são constituídos por células únicas e microcolônias, embebidas numa matriz, predominantemente aniônica e altamente hidratada, tendo, em 1990, Characklis e Marshal acrescentado que os biofilmes podem aderir às superfícies e entre eles, incluindo na definição os termos agregados microbianos e populações aderentes. Costerton e Lappin-Scott (1995) constataram ainda que o processo de produção dos componentes bacterianos necessários para a adesão e para a formação do biofilme é desencadeado pela expressão de determinados genes, enfatizando a ideia de que toda a produção de biofilme é regulada por informação genética específica, transcrita durante a fase inicial de ligação.

Um biofilme pode actualmente ser definido como uma comunidade séssil de microrganismos, caracterizada por células irreversivelmente aderentes a um substrato, interface, ou umas às outras, envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas mesmas, e que exibem um fenótipo alterado no que respeita à velocidade de crescimento e à transcrição de genes (Donlan & Costerton, 2002).

4.2. Estrutura

Duma maneira muito simplista podemos considerar que a estrutura de um biofilme é constituída por três ingredientes básicos: microrganismos, uma matriz extracelular polissacarídica e uma superfície de adesão. Se um destes componentes for removido, o biofilme não se desenvolve (Dunne, 2002).

A combinação de técnicas imagiológicas tridimensionais de alta resolução, técnicas moleculares de fluorescência e aparelhos de cultura específicos demonstrou, nos últimos anos, que os biofilmes não são apenas um aglomerado de bactérias presas a uma superfície mas um sistema biológico dinâmico e bastante complexo sob o ponto de vista estrutural (Hall - Stoodley, Costerton & Stoodley, 2004).

A estrutura do biofilme é afectada por variadíssimas propriedades tais como as características da superfície ou interface, a disponibilidade de nutrientes, os microrganismos envolvidos e dinâmica de fluidos. Por exemplo, biofilmes submetidos a grande tensão de corte, como por exemplo na superfície dentária durante a mastigação, são tipicamente estratificados e compactos (Davey and O'Toole, 2000).

Virtualmente qualquer superfície pode ser colonizada por microrganismos e servir de base para a formação de um biofilme, incluindo lentes de contacto, tubagens de leite e petróleo, pedras submersas e todo o tipo de implantes biomédicos e dispositivos transcutâneos. Nalguns casos, a própria superfície de adesão pode ser a fonte de nutrientes para as bactérias, como acontece na indústria do papel (Dunne, 2002).

Um biofilme pode abranger uma ou várias espécies bacterianas e pode ser formado sobre uma superfície biótica ou abiótica. Os biofilmes constituídos por várias espécies bacterianas ocorrem mais frequentemente em habitats naturais, enquanto os que são constituídos por uma única espécie são mais comuns em animais e humanos sujeitos a uma infecção (O'Toole et al., 2000).

Os investigadores têm focado a sua atenção nos biofilmes constituídos por uma única espécie bacteriana e *Pseudomonas aeruginosa* tem sido a bactéria de Gram negativo mais estudada. Biofilmes constituídos por *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas fluorescens*, juntamente com as bactérias de Gram positivo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e enterococci, também têm sido detalhadamente investigados (O'Toole et al., 2000).

Quanto à matriz extracelular, esta é uma substância heterogénea, constituída maioritariamente por polissacarídeos, mas que pode apresentar propriedades químicas e características físicas bastante variáveis, não só entre espécies distintas mas também dentro da mesma espécie, quando submetida a condições ambientais diferentes (Branda, Vik, Friedman & Kolter, 2005).

Estes polissacarídeos podem ser neutros ou polianiónicos, devido à presença de ácidos urónicos (ácidos D-glucurónico, D-galacturónico e manurónico), como acontece nos biofilmes constituídos por bactérias de Gram negativo ou catiónicos no caso de algumas bactérias de Gram positivo, como por exemplo staphylococci (Donlan, 2002).

As propriedades aniónicas da maioria dos biofilmes são importantes, porque permitem a associação de catiões divalentes, como o cálcio ou o magnésio, que promovem a ligação entre os vários polímeros, providenciando uma maior força de ligação entre os mesmos (Donlan, 2002). Resíduos inorgânicos como os fosfatos ou mais raramente sulfatos, também conferem à matriz propriedades polianiónicas (Sutherland, 2001). A maioria dos polímeros extracelulares apresenta simultaneamente propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas, embora uma minoria destes sejam exclusivamente hidrofóbicos (Donlan, 2002).

Foi recentemente demonstrado que os biofilmes contêm na sua composição DNA extracelular, que desempenha um papel estrutural importante na arquitectura dos mesmos. Foi provado ainda que algumas espécies bacterianas detêm grandes quantidades de RNA na sua matriz polissacarídica, e que algumas bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* desenvolveram a capacidade de utilizar o DNA extracelular presente na matriz como fonte de nutrição, quando submetidas a privação de fosfato, através da expressão de nucleases (Nijland, Hall & Burgess, 2010).

A substância extracelular caracteriza-se ainda pela capacidade de incorporar grande quantidade de água na sua estrutura através de pontes de hidrogénio. Quando hidratada, a matriz pode conter até 97% de água (Donlan 2002; Sutherland, 2001).

Materiais não celulares como minerais cristalizados, partículas provenientes de corrosão ou componentes sanguíneos, dependendo da superfície onde o biofilme se desenvolveu, também podem ser encontrados na sua matriz (Donlan, 2002).

4.3. Dinâmica de formação

O processo de formação de um biofilme (Figura 3) inicia-se sempre pela adesão bacteriana a uma superfície disponível (seja ela biótica ou abiótica) e é condicionado por vários factores, entre os quais a espécie bacteriana, factores ambientais, características da superfície e informação genética (Dunne, 2002).

A adesão primária entre bactérias e superfícies abióticas é geralmente mediada por ligações não específicas (p.ex. hidrofóbicas), enquanto a adesão a tecidos vivos ou desvitalizados é realizada através de mecanismos de ligação molecular específicos (com recurso a adesinas e lectinas) (Dunne 2002).

O processo de adesão pode ser dividido em duas fases: fase primária ou de ligação e fase secundária ou de bloqueio. A fase primária ou de ligação caracteriza-se pela aproximação de uma bactéria de vida livre a uma superfície, de forma aleatória ou recorrendo a mecanismos quimiotácticos ou de mobilidade bacteriana. Esta fase é reversível e condicionada por variáveis físico-químicas que vão definir a interacção entre a superfície celular bacteriana e a superfície livre. A adesão vai depender do balanço entre as forças de atracção e repulsão geradas entre elas, quando a bactéria atingir uma proximidade crítica em relação à superfície (geralmente menos de 1 μm). Estas forças incluem interacções electrostáticas e hidrofóbicas, forças de Van der Waals, temperatura, forças hidrodinâmicas, entre outras. As interacções electrostáticas tendem a favorecer a repulsão, uma vez que a maioria das bactérias e superfícies inertes se encontram carregadas negativamente. São provavelmente as interacções do tipo hidrofóbico as que mais contribuem para o sucesso da adesão primária (Dunne, 2002).

Há estudos que demonstram que este contacto primário geralmente ocorre entre o microrganismo e uma superfície previamente condicionada. Por exemplo a adesão de estafilococos coagulase-negativos a um substrato de polimetilmetacrilato é alcançada apenas quando a superfície é previamente revestida por proteínas plasmáticas, incluindo fibronectina. Os estafilococos apresentam múltiplos factores de aderência denominadas “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM)” que têm a característica de se ligarem precisamente às proteínas séricas que condicionam as superfícies. A MSCRAMM mais estudada em *S. epidermidis* é a proteína SdrG. A sua eliminação leva a uma diminuição da aderência deste microrganismo às superfícies condicionadas por fibrinogénio. Estudos recentes demonstraram ainda que esta proteína promove a adesão e agregação plaquetária (Fey & Olson, 2010).

A repulsão entre duas superfícies pode ser superada pelas interacções moleculares específicas mediadas por adesinas localizadas em estruturas da superfície celular. Assim, a manutenção da adesão primária depende do somatório das variáveis previamente enumeradas (Dunne, 2002).

A fase secundária de adesão (também denominada fase de bloqueio) é mediada por ligações entre adesinas específicas e a superfície e consolidada pela produção de uma matriz polissacarídica que forma complexos com a superfície e/ou com ligandos específicos localizados nos *pilli*, fímbrias ou ambos (Dunne, 2002).

No caso particular de *S. epidermidis* trata-se das adesinas/autolisinas At1E e Aae. Estas proteínas, para além das suas funções específicas de adesão (através de ligações não covalentes à vitronectina), libertam DNA extracelular, que como recentemente demonstrado, é um factor importante de aderência/agregação nas fases iniciais da formação de biofilmes constituídos por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (Fey & Olson, 2010).

No final desta fase secundária, a adesão torna-se irreversível na ausência de intervenções químicas ou físicas e o microrganismo está firmemente ligado à superfície (Dunne, 2002).

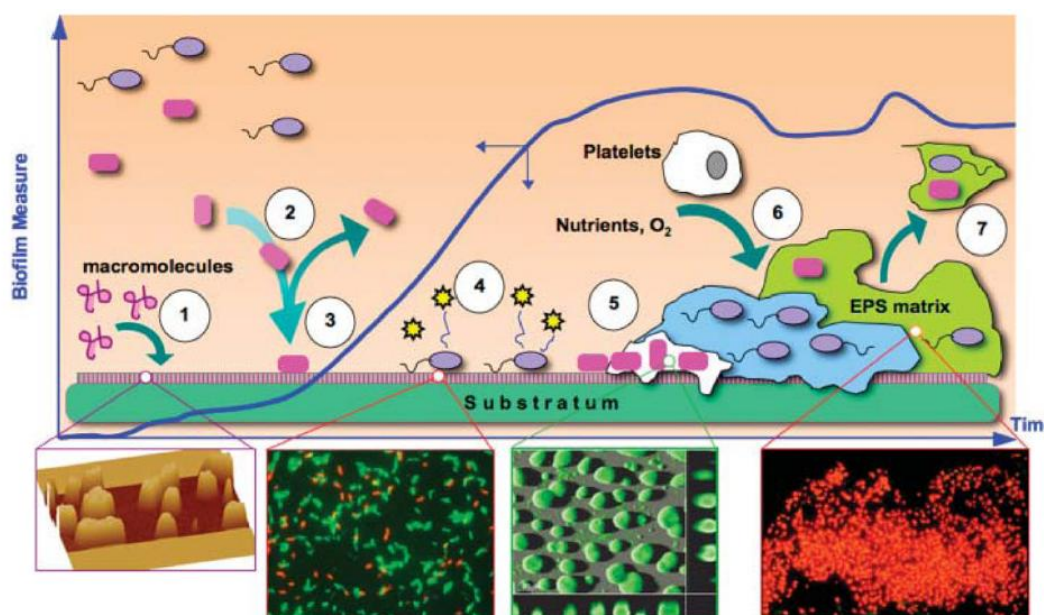
Durante esta fase, microrganismos livres podem vir a unir-se uns aos outros e às bactérias iniciais já envolvidas na formação do biofilme, formando-se agregados polibacterianos no substrato. A presença de uma espécie bacteriana aderente a uma superfície pode promover a adesão de outras (Dunne, 2002).

Uma vez aderentes à superfície de forma estável, inicia-se o processo de maturação. A densidade e a complexidade do biofilme vão aumentando à medida que os microrganismos nele envolvidos se começam a multiplicar (e morrer) activamente e os componentes extracelulares por eles produzidos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do meio ambiente, de maneira a formar o glicocálice (Dunne 2002).

O glicocálice, matriz extracelular que mantém as células bacterianas unidas, é composto maioritariamente por biopolímeros polissacarídicos e outros componentes, como proteínas e

DNA extracelular. A natureza desta matriz varia muito com as bactérias envolvidas, condições de crescimento, meio ambiente e tipo de substrato (Dunne, 2002).

Figura 3 – Processo de formação de biofilme (Adaptado de: Bryers, 2008)



A maioria das estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* utiliza o polímero N-acetil-glucosamida, também denominado adesina intercelular polissacarídica (PIA) para a formação de biofilmes. O gene *ica* codifica a “maquinaria” que sintetiza este polímero, embora nem todas os representantes das duas espécies o possuam. A sua eliminação não retira a capacidade de produção de biofilme em algumas estirpes, que possuem um mecanismo independente do gene *ica*. Este mecanismo baseia-se na capacidade de expressar proteínas adesivas que permite às células ligarem-se e colonizar uma grande variedade de superfícies. Em *S. aureus* estas proteínas adesivas denominam-se *Bap* (biofilm-associated proteins) e encontram-se ancoradas na parede celular da bactéria. A sua função é manter as células unidas no interior do biofilme, provavelmente interagindo com outras proteínas de superfície das células vizinhas. Em *S. epidermidis* são as proteínas *Aap* e *Bhp* que exercem a função equivalente (López, Vlamakis & Kolter, 2010; Fey & Olson, 2010).

Apesar da adesina intercelular polissacarídica (PIA) não ser essencial em todas as estirpes para a produção de biofilme, esta afecta significativamente a arquitectura do mesmo. As estirpes que expressam o gene *ica* apresentam uma formação em torre e uma estrutura tridimensional, ao contrário das que utilizam o mecanismo independente do *ica*. Além disso foi demonstrado que isolados de *S. epidermidis* que não sintetizam a PIA, não são capazes de formar biofilme quando submetidas a um fluxo de fluido aumentado, o que sugere que as estirpes positivas para PIA têm vantagem nas infecções com um alto nível de forças de stress (por exemplo no lúmen de catéteres) (Fey & Olson, 2010).

Para além dos exopolissacarídeos e das proteínas, o DNA extracelular também providencia estabilidade estrutural ao biofilme. Pensa-se que este DNA provem da lise celular e consequente libertação de DNA genómico (López et al., 2010).

O potencial de crescimento de qualquer biofilme é condicionado pela disponibilidade nutricional do meio ambiente, da perfusão desses mesmos nutrientes até às células incorporadas no biofilme e pela remoção dos seus desperdícios. Existe ainda um fluxo hidrodinâmico óptimo que favorece o crescimento e a perfusão em deterioração da erosão das camadas externas. Outros factores que controlam a maturação do biofilme incluem o pH, a perfusão de oxigénio, a disponibilidade de fontes de carbono e a osmolaridade (Dunne, 2002).

A participação de múltiplas moléculas na formação da matriz extracelular faz com que seja impossível definir um padrão. Existe uma variabilidade praticamente infinita de biofilmes, o que faz com que cada um seja único (López et al., 2010).

Mesmo nos biofilmes constituídos por uma única espécie bacteriana existem subpopulações fenotipicamente distintas. Surgem grupos de células especializadas dentro do biofilme devido a diferenças na expressão genética e não na sua composição. A diferenciação celular das comunidades bacterianas depende das condições ambientais a que estas são expostas. A concentração de oxigénio e a disponibilidade nutricional ao longo do biofilme não é igual, o que faz com que se formem microambientes aos quais as células bacterianas respondem alterando a sua expressão genética, formando microcolónias fenotipicamente distintas umas das outras (López et al., 2010).

Geralmente as células localizadas nas camadas externas do biofilme têm acesso mais facilitado a nutrientes e oxigénio e eliminam com maior facilidade os produtos tóxicos do seu metabolismo. Estas células são por isso metabolicamente muito activas, apresentam maiores dimensões e assemelham-se bastante às suas congéneres de vida livre. Por outro lado, as bactérias localizadas mais internamente, junto à superfície de adesão, são metabolicamente menos activas, mais pequenas e não se encontram num processo de divisão celular activo. Têm, no entanto, a vantagem de estarem mais protegidas contra agentes antimicrobianos e agressões ambientais (Anwar, Strap, Chen & Costerton, 1992).

Assim, apenas uma parte das células são metabolicamente activas, geralmente as que se localizam nas proximidades de fontes de oxigénio e nutrientes, podendo ser identificadas localizando as áreas onde ocorre síntese proteica e de DNA (López et al., 2010).

É importante referir que a localização e percentagem de cada tipo celular são dinâmicas. Nas fases iniciais de formação existe uma abundância de células dotadas de mobilidade mas que à medida que a maturação avança se vão transformando em células produtoras de matriz extracelular. Mais tarde e se houver falta de nutrientes, pode formar-se em certas bactérias, uma subpopulação de células persistentes, metabolicamente inactivas e altamente resistentes a agressões ambientais (Davey & O'Toole, 2000).

Assim, dentro do biofilme a esporulação, a produção de matriz extracelular e a motilidade ocorrem em subpopulações específicas (López et al., 2010).

As microcolónias, unidade básica de um biofilme, encontram-se separadas por espaços vazios intersticiais, também denominados canais. Utilizando técnicas de estudo de partículas os investigadores identificaram a presença de um fluxo de água através desses canais. Assim, os canais de água são essencialmente o saneamento do sistema, uma vez que providenciam um meio de circulação de nutrientes e eliminação de produtos metabólicos. Medições *in situ* dos níveis de oxigénio dissolvido, utilizando microeléctrodos, revelaram a presença de oxigénio profundamente no biofilme, o que demonstra que os canais transportam esta molécula. Provavelmente estes canais são parte vital da estrutura e funcionamento do biofilme, havendo mecanismos para a sua formação e manutenção, ainda por investigar (Davey & O'Toole, 2000).

Eventualmente o biofilme atinge uma massa crítica e um equilíbrio, o que faz com que as camadas externas de crescimento (nas zonas mais longínquas da superfície) comecem a gerar e libertar organismos livres, capazes de colonizar outras superfícies. Por sua vez as bactérias das camadas próximas à superfície ficam quiescentes ou morrem secundariamente a carências nutricionais ou de perfusão, diminuição do pH ou dos níveis de oxigénio ou a uma acumulação de metabolitos tóxicos (Dunne, 2002).

Existem evidências de que o desenvolvimento primário, maturação e dissolução de um biofilme são geneticamente controlados por genes cuja expressão é dependente da densidade populacional do mesmo, através de transmissão molecular intercelular.

Uma vez atingida a maturação verifica-se a alteração dos padrões de crescimento bacteriano, cooperação fisiológica e eficiência metabólica, o que providencia uma coordenação comunitária funcional que imita um tecido eucariótico primitivo (Dunne, 2002).

4.4. Comportamento colectivo

As bactérias são organismos capazes de significativa actividade colectiva. Uma diferenciação complexa e um comportamento interactivo já foram demonstrados em inúmeras situações. São exemplos a esporulação de *Bacillus subtilis* quando submetido a condições desfavoráveis, *Streptomyces coelicolor* durante a sua diferenciação morfológica em resposta a condições nutricionais extremas, entre outras. No entanto, e à primeira vista, nem todos os microrganismos parecem capazes de tais comportamentos colectivos coordenados, excepto se os considerarmos no contexto do biofilme. Seja formado por uma ou múltiplas espécies, o biofilme requer um comportamento intercelular para o seu desenvolvimento. A sua formação pode exigir coordenação, interacção e comunicação entre múltiplas espécies bacterianas (Davey & O'Toole, 2000).

Como anteriormente referido, a unidade estrutural básica do biofilme é a microcolónia. A proximidade das células bacterianas dentro da microcolónia (ou entre microcolónias) providencia um ambiente ideal para a criação de gradientes nutricionais, permuta genética e *quorum sensing*. Uma vez que as microcolónias podem ser constituídas por múltiplas espécies bacterianas, a “reciclagem” de vários nutrientes (azoto, enxofre e carbono) através de reacções redox pode facilmente ocorrer no contexto do biofilme (Donlan, 2002).

4.4.1. Permuta genética

Os biofilmes providenciam um ambiente ideal para o intercâmbio de DNA extracromossómico (plasmídeos). A conjugação ocorre a uma taxa muito maior no biofilme que entre células bacterianas de vida livre (Donlan, 2002).

Ghigo (2001) sugeriu que estirpes bacterianas medicamente relevantes que contêm plasmídeos conjugativos, desenvolvem biofilmes mais rapidamente. Também demonstrou que organismos receptores que formam biofilmes, na ausência dos plasmídeos, produzem apenas microcolónias sem qualquer desenvolvimento adicional.

Uma vez que os plasmídeos podem codificar resistências para múltiplos agentes antimicrobianos, o biofilme é também um mecanismo de selecção, promoção e dispersão de bactérias multirresistentes (Donlan, 2002).

4.4.2. *Quorum sensing*

As bactérias comunicam entre si. A comunicação intercelular geralmente é realizada recorrendo a produtos bacterianos, capazes de se difundir entre duas bactérias. A produção de moléculas *quorum-sensing* foi demonstrada quer em biofilmes naturais, quer nos cultivados *in vitro*. Foi ainda provado que esta sinalização intercelular tem um papel importante na adesão e destacamento das células no biofilme (Watnick & Kolter, 2000).

O *quorum sensing* é uma forma de comunicação bacteriana que ajuda a regular o comportamento colectivo. As bactérias libertam substâncias químicas denominadas autoindutores no meio ambiente que as envolve. À medida que a densidade populacional aumenta, o mesmo acontece com a concentração dos autoindutores. Quando a densidade populacional é suficientemente alta (isto é, o *quorum* é activado) a concentração dos autoindutores torna-se suficientemente elevada para se ligar a receptores presentes no interior ou à superfície das bactérias que se encontram nas proximidades. O sinal é então traduzido num sinal bioquímico intracelular ou alteração da expressão genética da bactéria alvo. Isto vai induzir mudanças fisiológicas adaptativas. O *quorum sensing* é muito difundido, ocorrendo em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. Até à data foram identificados três tipos de autoindutores: as lactonas acil-hemoserinas (AHLs), encontradas nas bactérias

de Gram negativo, os péptidos autoindutores (AIPs), encontrados nas bactérias de Gram positivo e os componentes autoindutores (AI-2s), encontrados em ambos os grupos (Raffa et al., 2005).

Os autoindutores induzem mudanças transcricionais que incluem bioluminescência, aumento da virulência, formação de biofilme, produção de antibióticos, aumento da competência e esporulação (Raffa et al., 2005).

Davies et al. (1998) demonstraram que dois sistemas de sinalização intercelular em *Pseudomonas aeruginosa* (lasR-lasI e rhIR-rhII) estão envolvidos na formação do biofilme. Quando se atinge uma densidade populacional suficiente, estes sinais atingem as concentrações necessárias para a activação de genes envolvidos na diferenciação celular. Estirpes incapazes de produzir ambos os sinais conseguem formar biofilmes, mas estes são muito mais finos, as células encontram-se mais densamente compactadas e falta a típica arquitectura, para além de serem muito mais facilmente removidos das superfícies por tratamentos surfactantes. A adição de lactona homoserina ao meio resulta em biofilmes semelhantes aos das estirpes que contêm os dois sistemas, no que respeita à estrutura e grossura do mesmo.

Por sua vez, Yung-Hua, Lau, Lee, Ellen e Cvitkovich (2001) demonstraram que a indução de competência genética (permitindo a incorporação de DNA exógeno por transformação) é também mediada por *quorum sensing* em *Streptococcus mutants*. A frequência de transformação é 10 a 600X maior em biofilmes que em células de vida livre.

Embora pouco se saiba do papel da sinalização intercelular nos biofilmes compostos por mais do que uma espécie bacteriana, pensa-se que difere significativamente daqueles formados apenas por uma. Espera-se que estes sinais sejam especialmente importantes em ambientes favoráveis ao crescimento bacteriano, onde as superfícies são fortemente colonizadas e a competição para a adesão à superfície é feroz. Estes sinais são produtos bacterianos, transportados passiva ou activamente, que alteram o estado do microrganismo vizinho de alguma maneira. Podem incluir metabolitos bacterianos, lactonas acil-homoserina, proteínas segregadas, material genético como DNA ou RNA ou qualquer outro produto bacteriano ainda por identificar. Estes sinais podem alterar a distribuição de espécies bacterianas específicas no biofilme, alterar a expressão proteica, introduzir novas características genéticas nas células vizinhas ou ainda atrair e incorporar bactérias dentro do biofilme, para consequente vantagem por parte das outras. As bacteriocinas são outro exemplo de sinais intercelulares que resultam em interacções letais entre espécies. São proteínas antibacterianas que actuam sobre espécies próximas filogeneticamente. Há estudos que sugerem que estas proteínas evoluíram precisamente por causa do seu papel dentro dos biofilmes, uma vez que são muito mais eficazes em ambientes confinados (Watnick & Kolter, 2000).

O impacto da comunicação intercelular em biofilmes com varias espécies bacterianas envolvidas é enorme, e quer seja benéfico ou prejudicial para o receptor, é um factor crítico na diversidade e distribuição das bactérias (Watnick & Kolter, 2000).

4.4.3. Predação e competição

Os microrganismos dentro dum biofilme podem ser sujeitos a predação por protozoários de vida livre, bacteriófagos e leucócitos polimorfonucleares, como resultado da concentração celular localizada (Donlan, 2002).

James, Beaudette e Costerton (1995) observaram que a competição também ocorre dentro dos biofilmes e demonstrou que a invasão de *Pseudomonas putida* num biofilme de *Hypomicrobium* spp. resulta numa dominância de *Pseudomonas putida* apesar de os números de *Hypomicrobium* se manterem relativamente constantes.

4.5. Função

O facto da maioria das bactérias possuir a capacidade de se organizar em biofilmes sugere que existe uma vantagem evolutiva para as bactérias aderentes à superfície em relação às que não o conseguem fazer (Dunne, 2002).

4.5.1. Protecção ambiental

As bactérias têm um certo grau de protecção e homeostase quando residem dentro de um biofilme e um dos componentes chave é a substância exopolimérica da matriz envolvente. Como anteriormente referido, a matriz é composta por uma mistura de componentes como exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias. A maioria das bactérias é capaz de produzir polissacarídeos, seja como componente para a sua parede, seja como substância extracelular para o meio envolvente (exopolissacarídeos). É importante referir que este componente desempenha vários papéis, quer na função quer na estrutura em diferentes biofilmes e que pode variar bastante mesmo em comunidades bacterianas semelhantes, quando submetidas a condições ambientais diversas. De um modo geral, a matriz previne o acesso de certos agentes antimicrobianos ao restringir a difusão destes compostos no biofilme, é capaz de fazer o sequestro de metais, cationes e toxinas, para além de proteger as bactérias de vários tipos de agressões ambientais, como radiações ultravioleta, modificações de pH, alterações da osmolaridade e dissecação (Davey & O'Toole, 2000).

A matriz extracelular também protege as bactérias do sistema imunológico do hospedeiro, dificultando a actividade fagocitária dos neutrófilos. Foi demonstrado que o

exopolissacarídeo PIA, presente em algumas espécies de staphylococci, é uma molécula específica que contribui significativamente para a defesa do biofilme estafilocócico (Otto, 2008).

4.5.2. Disponibilidade nutricional e cooperação metabólica

Os canais de água altamente permeáveis existentes ao longo do biofilmes nas áreas que rodeiam as microcolônias foram comparados a um sistema circulatório primitivo, providenciando um modo efectivo de troca de nutrientes e metabolitos. A elaborada arquitectura do biofilme fornece também a oportunidade de cooperação metabólica, uma vez que se formam nichos específicos dentro do mesmo (Davey & O'Toole, 2000).

Embora nem sempre se verifique, nos biofilmes mistos as microcolônias são muitas vezes compostas por mais do que uma espécie bacteriana. Estes microconsórcios podem resultar da associação entre organismos metabolicamente cooperativos e a sua proximidade facilita o intercâmbio de substâncias e a eliminação ou redistribuição de produtos metabólicos. Por exemplo a degradação de uma substância orgânica complexa em metano e carbono durante a digestão anaeróbica, exige a cooperação de pelo menos três tipos bacterianos. As bactérias fermentativas iniciam o catabolismo, produzindo ácidos e álcoois, que são prontamente utilizados como substrato pelas bactérias acetogénicas. Finalmente as bactérias metanogénicas obtêm energia ao converter acetato, dióxido de carbono e hidrogénio em metano. Assim, as bactérias dentro dum biofilme podem estar envolvidas em cooperações muito eficientes e dependência mútua (Davey & O'Toole, 2000).

Os biofilmes providenciam um ambiente ideal para o estabelecimento de relações sintrópicas. O sintropismo é um caso especial de simbiose, onde duas bactérias metabolicamente distintas dependem uma da outra para utilizar certos substratos, normalmente para a produção de energia (Davey & O'Toole, 2000).

4.5.3. Aquisição de novas características genéticas

A transferência horizontal de genes é importante para a evolução e diversidade das comunidades bacterianas naturais. A prevalência de plasmídeos em bactérias de diversos habitats está bem estabelecido e a transferência genética por conjugação é um dos mecanismos melhor compreendidos na disseminação de informação genética. Uma vez que a maioria das bactérias em condições naturais residem dentro dum biofilme, deduz-se que a conjugação também seja o mecanismo mais provável de transferência genética, dentro ou entre populações (Davey & O'Toole, 2000).

A transdução mediada por vírus é outro mecanismo de transferência genética. No final dos anos 80 descobriu-se a existência de uma grande abundância de vírus (acima de 10^8 /ml) na

água, quer doce, quer salgada, e que na sua grande maioria eram bacteriófagos. Vários procedimentos foram utilizados para avaliar o impacto destes vírus na mortalidade e transferência genética microbianas. Os dados indicam que a lise viral é a que mais contribui para a mortalidade bacteriana (10 a 20% de todas as bactérias são diariamente lisadas por fagos). Assim os fagos podem ter uma significativa influencia na disponibilidade nutricional das bactérias ao aumentar a mortalidade e/ou diminuir a taxa de multiplicação. No entanto, as bactérias que crescem em biofilmes no meio natural são mais resistentes à lise por bacteriófagos, o que faz com que a pressão selectiva para a sua constituição seja considerável. Não há evidência da presença de transdução em biofilmes, embora a alta concentração de fagos nos sistemas aquáticos indique que o potencial esta decididamente presente (Davey & O'Toole, 2000).

4.6. O papel do biofilme nas doenças

Segundo os postulados de Koch, um organismo presente nas lesões de determinada doença, isolado em cultura pura e inoculado noutra animal deve provocar lesões semelhantes às iniciais (Donlan & Costerton, 2002).

A questão se os biofilmes são agentes etiológicos de doença não pode ser provada segundo os seus postulados, mas segundo o relato de vários estudos existe uma forte correlação entre a presença desse factor de virulência e várias doenças (Donlan & Costerton, 2002).

O processo exacto através do qual os microrganismos organizados sob esta forma causam doenças como periodontite, endocardite valvular, fibrose cística, entre outras, está longe de ser completamente compreendido. Os mecanismos sugeridos incluem o destacamento celular, a libertação de endotoxinas, resistência ao sistema imunitário do hospedeiro e provisão de um nicho ecológico para organismos resistentes (Donlan & Costerton, 2002).

4.6.1. Destacamento celular

Bactérias isoladas ou aglomerados celulares podem separar-se dos biofilmes em consequência do seu crescimento e divisão. Estudos laboratoriais têm demonstrado que um aumento de forças de *stress*, consequência, por exemplo, do aumento da taxa e mudança de direcção do fluxo, resulta num aumento da taxa de erosão celular do biofilme. Foi ainda comprovado que o destacamento celular pode estar relacionado com mudanças na concentração do substrato e que as moléculas de lactona acil-hemoserina podem mediar este mecanismo. Independentemente da razão, as células bacterianas destacadas podem causar uma infecção. Infecções sanguíneas e do tracto urinário podem ser provocadas por um pequeno número de bactérias (Donlan & Costerton, 2002).

4.6.2. Libertação de endotoxinas

Em adição aos efeitos directos do destacamento celular e da resistência antimicrobiana (discutida mais à frente), as bactérias de Gram negativo do interior dos biofilmes presentes em dispositivos médicos libertam endotoxinas que podem provocar uma resposta imunitária do paciente (Donlan & Costerton, 2002).

4.6.3. Resistência ao sistema imunológico do hospedeiro

Os microrganismos destacados a partir de um biofilme têm uma maior probabilidade de resistir às defesas do sistema imunológico e causar infecção. Vários estudos têm demonstrado o seu papel na inactivação das defesas específicas do hospedeiro (Donlan & Costerton, 2002).

Segundo Shiau e Wu (1998) a matriz extracelular produzida por *S. epidermidis* interfere com a actividade fagocitária dos macrófagos.

Maluleni, Grout, Evans e Pier (1995) demonstraram que os anticorpos opsonizantes, produzidos por pacientes com fibrose cística crónica, não conseguem provocar uma resposta fagocitária apropriada e consequente eliminação das bactérias presentes nas microcolónias do biofilme.

Um estudo realizado por Ward, Olson, Lam e Costerton (1992) em coelhos mostrou que as bactérias do biofilme presentes num implante pericárdico não eram afectadas pelo sistema imunológico do animal vacinado, apesar de o título de anticorpos em animais vacinados ser até 1000 vezes superior.

Yasuda, Ajiki, Aoyama e Yokota (1994), por sua vez, demonstraram que células de *E. coli* que cresceram dentro de um biofilme e foram posteriormente ressuspensas, tinham a mesma sensibilidade à fagocitose que as suas congéneres de vida livre, mas eram menos sensíveis aos leucócitos polimorfonucleares humanos *in vitro*.

4.6.4. Formação de um nicho para uma geração de organismos resistentes

Foi demonstrado que as bactérias podem trocar plasmídeos por conjugação no interior dos biofilmes, plasmídeos esses que podem transportar genes de resistência antimicrobiana. A proximidade física das células dentro das microcolónias no biofilme favorece essa conjugação (Roberts & Mullany, 2010; Donlan & Costerton, 2002).

Ehlers e Bouwer (1999) demonstraram que a taxa de conjugação entre diferentes espécies de *Pseudomonas* é significativamente maior em biofilmes que a dos mesmos microrganismos de vida livre (taxa de tranconjugação/beneficiário 10^{-2} vs 10^{-7}).

4.7. O biofilme e a resistência a fármacos antimicrobianos

Um dos maiores feitos da medicina moderna foi o grande avanço no combate às doenças infecto-contagiosas. Actualmente a grande maioria das infecções agudas bacterianas pode ser tratada com sucesso através do recurso a agentes antimicrobianos.

Há no entanto, duas importantes excepções a esta regra. Em primeiro lugar encontramos as espécies bacterianas que são resistentes aos antibióticos de forma inata e em segundo, os microrganismos que residem dentro de um biofilme (Davey & O'Toole, 2000).

Uma bactéria envolvida por biofilme pode ser até 1000 vezes mais resistente a um antibiótico, que o mesmo microrganismo com crescimento livre (Tabela 3) (Davey & O'Toole, 2000).

A resistência é a capacidade de um microrganismo em crescer na presença de uma concentração elevada de um antimicrobiano. Uma estirpe, cuja concentração inibitória mínima (CIM) está elevada, é considerada resistente. No entanto, este critério convencional não se aplica às células bacterianas dentro de um biofilme, que não mostram necessariamente uma CIM aumentada (Lewis, 2001). É a estrutura natural do biofilme e a actividade fisiológica dos microrganismos nele envolvidos que confere uma resistência inerte às substâncias antimicrobianas, sejam elas antibióticos, desinfectantes ou germicidas (Donlan & Costerton, 2002).

Tabela 3 - Susceptibilidade de bactérias de vida livre e biofilme a determinados agentes antimicrobianos (Adaptado de Donlan & Costerton, 2002)

Organismo	Antibiótico	CIM/CBM	CIM/CBM
		Células vida livre (micg/ml)	Células biofilme (micg/ml)
<i>S. aureus</i>	Vancomicina	2 (CBM)	20 _a
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	1 (CIM)	1024 _b
<i>E.coli</i>	Ampicilina	2 (CIM)	512 _b
<i>P. pseudomallei</i>	Ceftazidima	8 (CBM)	800 _a
<i>S. sanguis</i>	Doxiciclina	0.063 (CIM)	3,15 _c

a- redução de 99% b- erradicação mínima c- redução >99,9

É importante perceber que, uma vez estabelecidos, os biofilmes desenvolvem uma estrutura complexa na qual diferentes células ocupam ambientes distintos. Esta diversidade fisiológica e genética é uma parte importante do biofilme. Uma vez que as células são submetidas a condições ambientais diferentes, a sua fisiologia será naturalmente também diferente. Assim, é muito provável que um fármaco que seja eficaz contra uma população não o seja contra outra presente dentro do mesmo biofilme. Os níveis de acidez, a concentração de

oxigénio e a disponibilidade de ferro, por exemplo, variam drasticamente entre subpopulações. Estas variações ambientais a que são submetidas, faz com que as células divirjam geneticamente entre si, e esta diversidade pode ser o problema chave nas resistências antimicrobianas. Os investigadores referem a presença de pequenas comunidades de células denominadas “persistentes”, que sobrevivem aos ataques antibióticos e imunológicos e que rapidamente recolonizam o biofilme. Isto é possível porque as células “persistentes” têm acesso a todos os nutrientes que necessitam, nutrientes esses que provêm precisamente da morte celular das bactérias que foram afectadas pelo antibiótico ou sistema imunitário do hospedeiro (Monroe, 2007). Estas bactérias “persistentes” constituem um mecanismo de segurança da espécie, permitindo que algumas células sobrevivam mesmo que o antibiótico atinja toda a população (Lewis, 2001).

Os factores responsáveis pelo aumento da resistência a antibióticos nos biofilme citados pela maioria dos autores incluem: diminuição da penetração do agente antimicrobiano através do biofilme, diminuição da taxa de multiplicação bacteriana e as várias mudanças fisiológicas presentes. Estes factores, sozinhos ou combinados, explicam a sobrevivência dos biofilmes numa serie de situações (Anderson & O’Toole, 2008; Lewis, 2001).

4.7.1. Penetração retardada

As moléculas antimicrobianas têm que se difundir através da matriz do biofilme para conseguir alcançar as bactérias por ela envolvidas. As substâncias poliméricas extracelulares que a constituem são uma barreira de difusão, influenciando quer a taxa de transporte para o interior do biofilme, quer a reacção do antimicrobiano com o material da matriz (Donlan & Costerton, 2002).

Suci, Mittelman, Yu e Geesey (1994) demonstraram a penetração retardada da ciprofloxacina em biofilmes de *Pseudomona aeruginosa*. O antibiótico normalmente demora 40 segundos a actuar numa superfície estéril, necessitando de 21 minutos para uma superfície que contém um biofilme. Por sua vez Hoyle, Williams e Costerton (1992) demonstraram que as bactérias de vida livre são 15 vezes mais susceptíveis à torbamicina do que as que se encontram incorporadas num biofilme.

Souli e Giamarellou (1998), por sua vez, investigaram a capacidade da matriz de *Staphylococcus epidermidis* em impedir a susceptibilidade bacteriana de *Bacillus subtilis* a vários agentes antimicrobianos e nem todos foram igualmente afectados por esta camada de exopolissacarídeos. A eficácia de glicopéptidos como a vancomicina e a teicoplanina foi significativamente afectada, enquanto agentes como a rifampicina, clindamicina e o grupo dos macrólidos não foram afectados ou foram-no minimamente.

Os antibióticos beta-lactâmicos têm uma difusão mais rápida através da matriz do biofilme que os aminoglicosídeos, uma vez que os últimos se ligam numa fase inicial aos alginatos (Donlan e Costerton, 2002).

Outro papel importante para evitar que os antibióticos atinjam os seus alvos (citoplasma, membrana citoplasmática ou parede celular) é desempenhado pela repulsão electrostática ou sequestro por parte dos polímeros presentes na matriz. No caso particular de staphylococci, a PIA protege as bactérias de péptidos antimicrobianos carregados, quer positiva, quer negativamente. Similarmente o ácido poli-gama-glutâmico, um exopolímero presente em *S. epidermidis* e vários outros estafilococos coagulase-negativos contribui para a resistência a péptidos antimicrobianos com qualquer carga (Otto, 2008).

A penetração retardada vai fazer com que o antimicrobiano atinja o biofilme em concentração bastante mais baixa ajudando as enzimas como a beta-lactamase a destruir o antibiótico que penetra. Esta sinergia entre a penetração retardada e a degradação antimicrobiana providencia aos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* que expressam beta-lactamases, uma resistência eficaz. Outro exemplo de protecção eficaz através da penetração retardada é o que ocorre com as moléculas de peróxido de hidrogénio. Ao contrário das células livres de *P. aeruginosa* que são altamente sensíveis a esta molécula, quando incorporadas dentro dum biofilme estas, apesar de apresentarem níveis consideravelmente mais baixos de catalase, encontram-se efectivamente protegidas. A penetração restrita, juntamente com a sua destruição pelas células microbianas é aparentemente responsável pela resistência. Assim, é de esperar que qualquer mecanismo de destruição ou modificação antimicrobiana (como por exemplo a acetilação dos aminoglicosídeos) vai ser especialmente eficaz quando acoplada à barreira de difusão dos biofilmes (Lewis, 2001).

4.7.2. Diminuição da taxa de multiplicação bacteriana

As células bacterianas, quando associadas em biofilme, multiplicam-se significativamente mais devagar que as de vida livre e como consequência são mais lentamente afectadas pelos agentes antimicrobianos (Donlan & Costerton, 2002).

Virtualmente, todos os fármacos antimicrobianos são mais eficazes em destruir células bacterianas em rápida multiplicação. Para alguns agentes antimicrobianos é absolutamente necessária uma taxa de crescimento celular elevada, como por exemplo a penicilina e a ampicilina. Alguns dos antibióticos mais avançados como os beta-lactâmicos, as cefalosporinas, as fluorquinolonas e os aminoglicosídeos podem matar células que não estão em crescimento, mas são muitíssimos mais eficazes na presença de divisão celular bacteriana rápida. A diminuição da taxa de crescimento contribui sem dúvida para a resistência do biofilme (Lewis, 2001).

Um estudo realizado por Evans, Alisson, Brown e Gilbert (1990) demonstrou que a taxa de crescimento de *Staphylococcus epidermidis* sob a forma de biofilme influencia fortemente a sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Quanto maior a taxa de crescimento bacteriano, maior a taxa de inativação das células bacterianas pela ciprofloxacina. Já Awnar, Strap, Chen e Costerton (1992) demonstraram que biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* mais antigos (10 dias) são significativamente mais resistentes à tobramicina e à piperacilina que biofilmes mais jovens (2 dias). Resultados semelhantes foram observados com várias combinações bacterianas e agentes antimicrobianos.

4.7.3. Outras mudanças fisiológicas devidas ao modo de crescimento do biofilme

Bactérias de Gram negativo respondem a restrições nutricionais e outras agressões ambientais sintetizando factores sigma. Em *E. coli* estes factores sigma, controlados pelo gene *rpoS* regulam a transcrição de genes, cujos produtos atenuam os efeitos da agressão (Donlan e Costerton, 2002).

Ao estudar biofilmes de *E. coli* formados por estirpes que possuem ou não possuem o gene *rpoS*, Adams e McLean (1999) mostraram que as *E. coli rpoS* positivas apresentam maiores densidades e maior número de microrganismos viáveis. Uma vez que o gene é activado quando a taxa de crescimento do microrganismo é baixa, parece que as condições que provocam esta diminuição na multiplicação celular, como limitações nutricionais ou acumulação de metabolitos tóxicos, favorecem a formação de biofilmes. As limitações nutricionais e a acumulação de metabolitos tóxicos podem ser particularmente graves nas camadas mais profundas de biofilmes já estabelecidos.

Tresse, Jouenne e Junter (1995) demonstraram que células de *E. coli* são mais resistentes aos aminoglicosídeos à medida que a pressão de oxigénio decresce e sugeriu que este efeito era devido à menor absorção de antibiótico pelas células com falta de perfusão de oxigénio.

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM STAPHYLOCOCCI ISOLADOS DA PELE DE CANÍDEOS

CAPÍTULO 2:

TRABALHO LABORATORIAL

Os staphylococci são responsáveis por grande parte das dermatites caninas além de fazerem parte da microbiota cutânea normal da espécie. Uma vez que se trata de um género com reconhecida capacidade de produzir biofilme, e dada a relação entre esse factor de virulência e a multirresistência bacteriana, problema cada vez mais significativo em Medicina, pretendeu-se através deste trabalho:

- Avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e capacidade de produção de biofilme de staphylococci isolados de pele de canídeos pertencentes a dois grupos distintos (com e sem dermatite).
- Comparar as características dos microrganismos dos dois grupos no que diz respeito aos parâmetros estudados.
- Analisar a relação entre a capacidade de produção de biofilme e a resistência a agentes antimicrobianos no género *Staphylococcus*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem

1.1. População em estudo

A população bacteriana sobre a qual este estudo incidiu é constituída por 21 staphylococci, isolados a partir da superfície cutânea de 31 canídeos, 17 machos e 14 fêmeas, com idades compreendidas entre 1 e 14 anos, presentes à consulta do Hospital Veterinário do Restelo no período entre 13 de Setembro de 2010 e 20 de Março de 2011.

Os cães utilizados no estudo encontram-se divididos em dois grupos. O primeiro grupo compreendeu 20 animais (Tabela 4), que à data da colheita da amostra não evidenciavam qualquer sinal de doença dermatológica, apresentando-se à consulta por outro motivo.

Tabela 4 – Animais pertencentes ao grupo 1

Amostra	Sexo	Raça	Idade	Motivo da consulta
S1	F	Pincher miniatura	1 A	OVH por hidrometra
S2	F	Pastor Alemão	11 A	Pancreatite
S3	M	Epagneul Breton	8 A	Claudicação MPD
S4	M	Indeterminada	10 A	Tosse/Nódulos pulmonares
S5	M	Spitz Anão	8 A	Dor cervical
S6	F	Dobermann	1 A	Ostectomia da cabeça do fémur
S7	F	Boxer	14 A	Vômito e colapso
S8	F	Pug	6 A	OVH
S9	M	West Highland T.	13 A	Convulsão
S10	M	Indeterminada	11 A	Derrame pericárdico
S11	F	Castro Labreiro	8 A	Gastrite/Hepatomegalia
S12	F	Podengo	8 A	Ecocardiografia de reavaliação
S13	M	Indeterminada	3 A	Teste dirofilariose
S14	F	Yorkshire terrier	3 A	OVH
S15	F	Yorkshire terrier	1 A	OVH
S16	M	Dálmata	8 A	Osteossarcoma
S17	F	Indeterminada	13 A	Efusão pleural
S18	M	Serra D'Aires	14 A	Convulsões
S19	M	Indeterminado	11 A	Convulsões
S20	F	Indeterminada	4 A	Extracção dente

M – Macho

F- Fêmea

A - Ano

O segundo grupo é formado por 11 animais (Tabela 5) que à data da consulta apresentavam uma dermatite clínica de causa variada ou ainda indeterminada.

Tabela 5 – Animais pertencentes ao grupo 2

Amostra	Sexo	Raça	Idade	Motivo da consulta
D1	M	Rafeiro Alentejano	9 A	Lesões cutâneas generalizadas
D2	M	Indeterminada	7 A	Lesões cutâneas no dorso
D3	M	Labrador	7 A	Linfoma cutâneo
D4	M	Basset Houd	6 A	Dermatite no pescoço
D5	F	Gran Danois	5 A	Torção esplénica
D6	M	Indeterminada	11 A	Piodermatite generalizada
D7	F	Indeterminada	4 A	Otite e lesões cutâneas
D8	M	Labrador	6 A	Dermatite interdigital
D9	F	Indeterminada	8 A	Suspeita de Leishmaniose
D10	M	Indeterminada	8 A	Pápulas e pústulas no abdómen
D11	M	Labrador	5 A	Dermatite atópica

M – Macho F- Fêmea A - Ano

1.2. Critérios de inclusão

Todas as amostras foram recolhidas a partir de animais seleccionados de acordo com critérios previamente estabelecidos.

Do grupo 1 fazem parte apenas cães que não apresentavam qualquer sinal de dermatite à data da colheita da amostra, apresentando-se à consulta por outro motivo. O motivo da consulta não foi considerado um factor de selecção, desde que o animal não estivesse a ser submetido a nenhum tratamento antimicrobiano.

Quanto ao grupo 2, foram incluídos apenas cães que se apresentaram à consulta com uma dermatite clínica local ou generalizada, mas sem qualquer tratamento antibiótico instituído.

O tratamento antibiótico foi um factor de exclusão, uma vez que pode alterar a microbiota cutânea dos animais, interferindo nos resultados do estudo.

Todos os proprietários foram informados do estudo e autorizaram a participação dos seus animais.

1.3. Método de colheita

A colheita das amostras, cujo fim foi a análise bacteriológica, foi realizada com o auxílio de zaragatoas estéreis, previamente embebidas em soluto fisiológico estéril, que foram

passadas com movimentos circulares em cerca de 5 cm² de pele nos animais em estudo (Figura 4).

Nos animais do primeiro grupo as zonas de eleição foram as zonas glabras (axilas e virilhas), enquanto no 2º grupo foram escolhidas as feridas que se apresentavam mais exsudativas.

Figura 4 – Recolha de material de um animal do grupo 1 (original)



Após a colheita as zaragatoas foram acondicionadas em meio de Amies à temperatura ambiente e levadas no prazo máximo de 12 horas ao Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa onde foram analisadas.

2. Processamento das amostras

2.1. Isolamento bacteriano

O primeiro passo no processamento das amostras consistiu no isolamento bacteriano, que foi iniciado através da sementeira das amostras em três meios de cultura.

Para cada zaragatoa realizou-se uma sementeira por estria, primeiro numa placa de Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro (COS, BioMérieux), seguida de uma sementeira, também por estria, numa placa de Agar Mac Conckey (MCK, BioMérieux). A amostra foi ainda semeada por incorporação em caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion Broth

(BHIB, LioFilchem). As placas e o tubo foram então incubados em atmosfera de aerobiose a 37 ° C, durante 24 horas e posteriormente observados.

Foram consideradas positivas todas as amostras que às 24 horas apresentavam colónias macroscopicamente visíveis nas placas de COS e/ou MCK ou em que o meio de enriquecimento BHIB apresentava turvação (sinal de crescimento bacteriano).

Nos casos em que se verificou crescimento apenas nos tubos de BHIB, procedeu-se a uma nova sementeira por estria para placas COS e MCK, mas desta vez a partir do caldo de enriquecimento positivo, com posterior incubação em atmosfera de aerobiose a 37 °C durante 24 horas.

Todas as colónias foram cuidadosamente observadas e descritas de acordo com as suas características físicas, procedendo-se de seguida ao seu isolamento.

O isolamento foi realizado com o auxílio de uma ansa, seleccionando uma colónia isolada e procedendo à sua sementeira por estria numa placa COS, com posterior incubação em atmosfera de aerobiose a 37 °C, durante 24 horas (Figura 5).

Figura 5 - Cultura pura em meio COS (original)



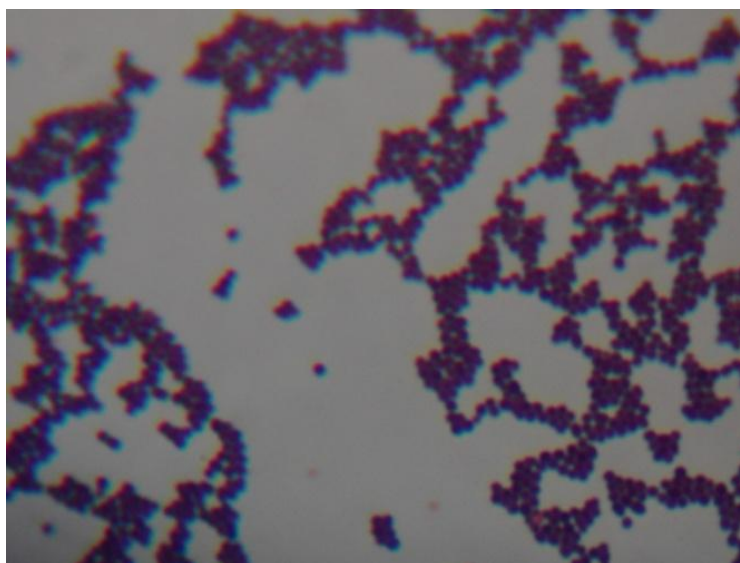
Todas as colónias isoladas foram macroscopicamente analisadas quanto à sua morfologia (forma, cor, dimensões, hemólise) e pureza. Nos casos de contaminação procedeu-se a um novo isolamento, como anteriormente descrito.

2.2. Identificação bacteriana

A partir de cada uma das colónias isoladas foi feita uma preparação microscópica, corada pelo método de Gram e observada ao microscópio óptico com a objectiva de imersão

(ampliação 1000X). Através dessa observação foi confirmada a pureza da cultura e registada a morfologia das bactérias: bacilo/coco, Gram + ou – (Figura 6)).

Figura 6 – Cocos de Gram positivo (original) (Ampliação 1000X)



Procedeu-se posteriormente a dois testes preliminares de identificação: teste da catalase e teste da oxidase.

O teste da catalase foi utilizado em todos os cocos de Gram positivo, sendo os catalase positivos classificados como *Staphylococcus*, enquanto os catalase negativos como *Streptococcus*. Por sua vez o teste da oxidase foi utilizado em todos os bacilos de Gram negativo para distinção entre enterobacteriaceas (oxidase negativas) e não enterobacteriaceas (oxidase positivas).

Todos os isolados foram, nesta fase, guardados em criotubos e conservados a -20 °C, prosseguindo a análise apenas para os representantes identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus*.

2.3. Identificação da espécie

Todos os cocos de Gram positivo, catalase positivos foram submetidos a testes bioquímicos comerciais específicos para este género, com o objectivo de identificar da espécie bacteriana em questão. Foi preferencialmente utilizado o painel bioquímico API 20 Staph (BioMérieux) (Figura 7). Quando este teste não apresentava resultados fidedignos recorreu-se ao painel Crystal Gram + (BBL). Em algumas amostras utilizou-se ainda o ID32 Staph (BioMérieux). Foram seguidos os protocolos disponibilizados pelos respectivos fabricantes e a leitura foi feita através duma plataforma informática também disponibilizada pelas empresas.

Figura 7 – Painel bioquímico API 20 Staph preenchido (original)



2.4. Teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos

A todos os staphylococci identificados foi realizado um teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, pelo método de difusão em disco (Bauer & Kirby, 1966), de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

Foi feita uma suspensão em soro fisiológico utilizando cerca de 5-6 colônias do isolado, de modo a obter uma densidade óptica na ordem dos 0,5 na escala de MacFarland. Essa suspensão foi inoculada com o auxílio de uma zaragatoa estéril em duas placas com meio de Mueller-Hinton (MH, Oxoid). Em cada placa foram colocados 6 discos antibióticos (Oxoid), num total de 12 princípios ativos.

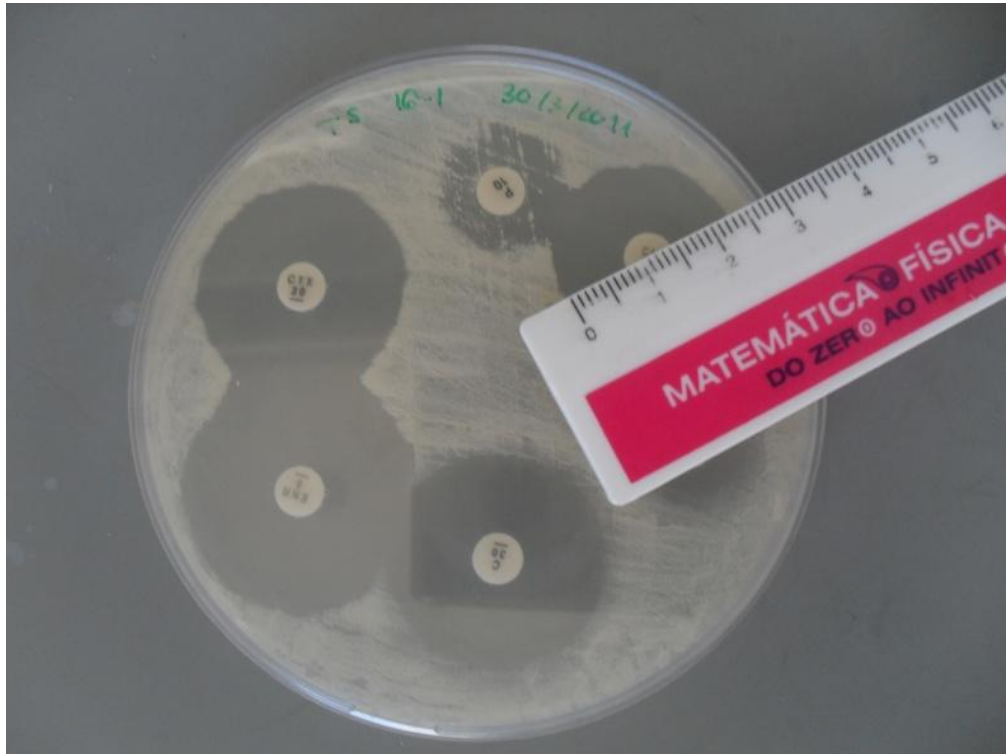
Os princípios activos utilizados fazem parte do painel antibiótico geral previamente estabelecido no laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária que é formado pelos seguintes agentes antimicrobianos:

- Penicilina G (10 UI) - P
- Ampicilina (10µg) - AMP
- Amoxicilina associada ao ácido clavulânico (2:1 30µg) - AMC
- Cefalexina (30µg) - CL
- Cefotaxima (30µg) - CTX
- Cloranfenicol (30µg) - C
- Estreptomicina (10µg) - ST
- Gentamicina (10µg) - CN
- Ácido nalidíxico (30µg) - NA
- Enrofloxacina (5µg) - ENR
- Sulfametoxazol/trimetoprim (25µg) - STX
- Tetraciclina (30µg) - TE

Após colocação dos discos antibióticos, cada placa foi incubada a 37 °C, durante 24 horas, em atmosfera de aerobiose. Após a incubação foi medido o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano de cada um dos discos antibióticos em milímetros (Figura 8). O halo

de inibição corresponde à zona em torno do disco de antibiótico em que o crescimento bacteriano é inibido se a estirpe bacteriana for susceptível ao antibiótico em causa, sendo o tamanho do halo proporcional ao grau de susceptibilidade.

Figura 8- Medição do halo de inibição de crescimento bacteriano (original)



De acordo com os critérios interpretativos disponibilizados pelo CLSI a bactéria foi classificada de susceptível (alta probabilidade de um resultado clínico favorável), intermédia (zona tampão; resposta pode ser menor que para as estirpes classificadas como susceptíveis) ou resistente (sem resultado clínico favorável) a cada um dos princípios activos testados.

Os critérios de interpretação específicos para Medicina Veterinária estão disponibilizados no documento M31-A3 (CLSI, 2008). Os critérios de interpretação para Cefalexina foram igualmente os preconizados no documento M31-A1 para cefalosporinas de 1ª geração.

Para os agentes antimicrobianos sem critérios interpretativos específicos para Medicina Veterinária, foram usados critérios interpretativos de Medicina Humana segundo as normas do documento M100-S16 (CLSI, 2006).

Tabela 6 – Critérios interpretativos dos agentes antimicrobianos utilizados

Antibiótico	Abreviatura	Carga	Limites dos diâmetros (mm)		
			Sensível (S)	Intermédio (I)	Resistente (R)
Penicilina ^a	P	10 UI	≥ 29	-	≤ 28
Ampicilina ^a	AMP	10 µg	≥ 29	-	≤ 28
Amoxicilina/Ac. clav ^a	AMC	2:1 30 µg	≥ 20	-	≤ 19
Cefalexina ^a	CL	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefotaxima ^b	CTX	30 µg	≥ 23	15-22	≤ 14
Cloranfenicol ^a	C	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17
Estreptomicina ^b	ST	10 µg	≥ 16	13-15	≤ 12
Gentamicina ^a	CN	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Ácido nalidíxico ^b	NA	30 µg	≥ 19	14-18	≤ 13
Enrofloxacin ^a	ENR	5 µg	≥ 23	17-22	≤ 16
Sulfa/trimetoprim ^a	STX	25 µg	≥ 16	11-15	≤ 10
Tetraciclina ^a	TE	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14

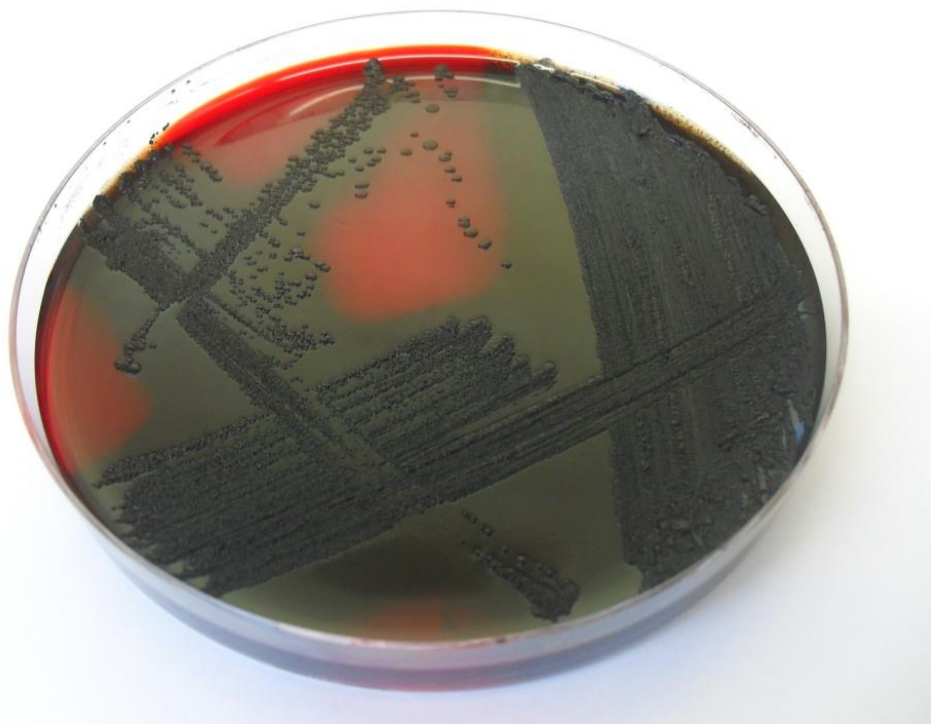
^a CLSI M31-A3, 2008^b CLSI M100-S16 2006

2.5. Biofilme

O trabalho laboratorial foi concluído após verificação, *in vitro*, da capacidade de produção de biofilme por parte de cada um dos staphylococci identificados. A técnica utilizada foi a de expressão fenotípica das colónias em agar Vermelho de Congo (Figura 9) descrita por Oliveira, Bexiga, Nunes, Carneiro, Cavaco, Bernardo & Vilela (2006). Cada estirpe foi inoculada no meio de Vermelho de Congo, previamente esterilizado por filtração, através de sementeira por estria e incubada durante 18 horas em atmosfera de aerobiose a 37 °C.

Todas as colónias pretas foram consideradas positivas, enquanto as vermelhas foram classificadas como negativas. Utilizaram-se dois controlos, *Staphylococcus epidermidis* *rp62a* e *Staphylococcus epidermidis* *atcc12228*, positivo e negativo respectivamente, para facilitar a interpretação dos resultados.

Figura 9 – *Staphylococcus epidermidis* rp62a em meio Vermelho de Congo utilizado como controlo positivo (original)



3. Tratamento estatístico dos dados

Uma vez concluído o trabalho laboratorial, os resultados obtidos foram submetidos a uma análise estatística pelo método de Wilcoxon Signed Ranks Test.

Foram analisados os dados respectivos à produção de biofilme, à resistência aos vários compostos e grupos antimicrobianos e a correlação entre os dois factores de virulência no grupo 1, no grupo 2 e entre ambos os grupos.

RESULTADOS

1. Microorganismos Isolados

Das 31 amostras pertencentes aos dois grupos estudados foram isolados e identificados vários tipos de microrganismos expostos nas Tabelas 7 e 8 e nos Gráficos 1 e 2.

Tabela 7 – Principais isolados bacterianos de animais do Grupo 1

Amostra	Isolado(s) Bacteriano(s)
S1	<i>Streptococcus</i>
S2	Dois <i>Staphylococcus</i> ; <i>Streptococcus</i>
S3	Bacilos +; <i>Enterobacteriaceae</i>
S4	<i>Streptococcus</i> ; dois Bacilos +;
S5	<i>Staphylococcus</i> ; Bacilos +; <i>Enterobacteriaceae</i>
S6	Negativo
S7	Dois Não <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
S8	<i>Staphylococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
S9	<i>Enterobacteriaceae</i>
S10	Dois <i>Staphylococcus</i> ;
S11	<i>Staphylococcus</i> ; <i>Streptococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
S12	<i>Streptococcus</i> ; Dois <i>Enterobacteriaceae</i> ; Não <i>Enterobacteriaceae</i>
S13	<i>Staphylococcus</i> ;
S14	<i>Staphylococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
S15	Dois <i>Staphylococcus</i> ; <i>Streptococcus</i> ;
S16	<i>Staphylococcus</i>
S17	Bacilos +
S18	Negativo
S19	<i>Streptococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
S20	Negativo

Gráfico 1 – Isolados bacterianos dos animais do Grupo 1 (percentagem)

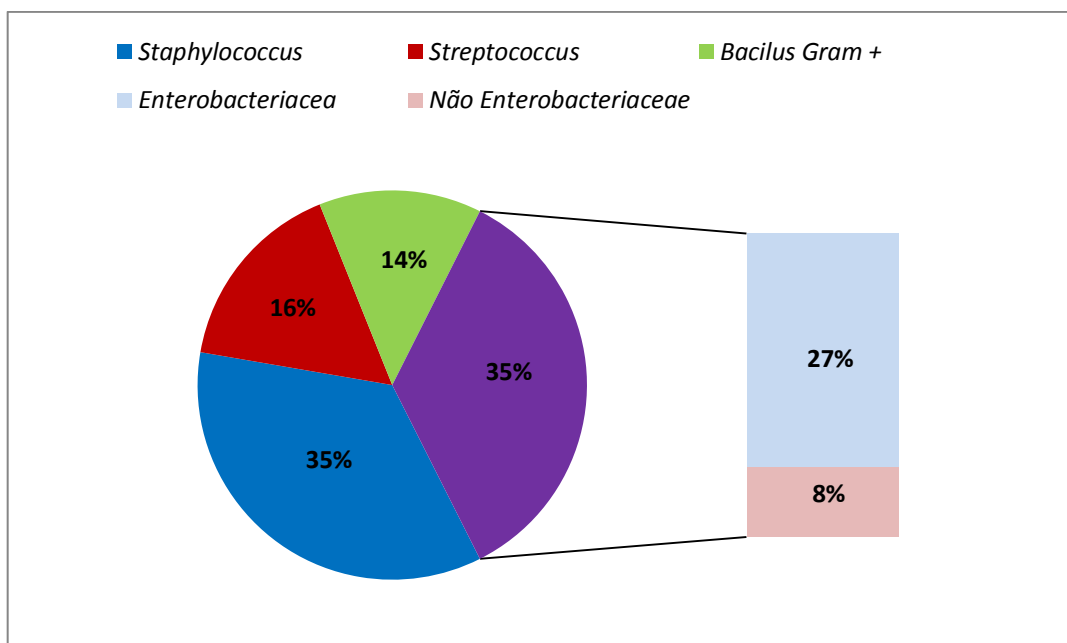
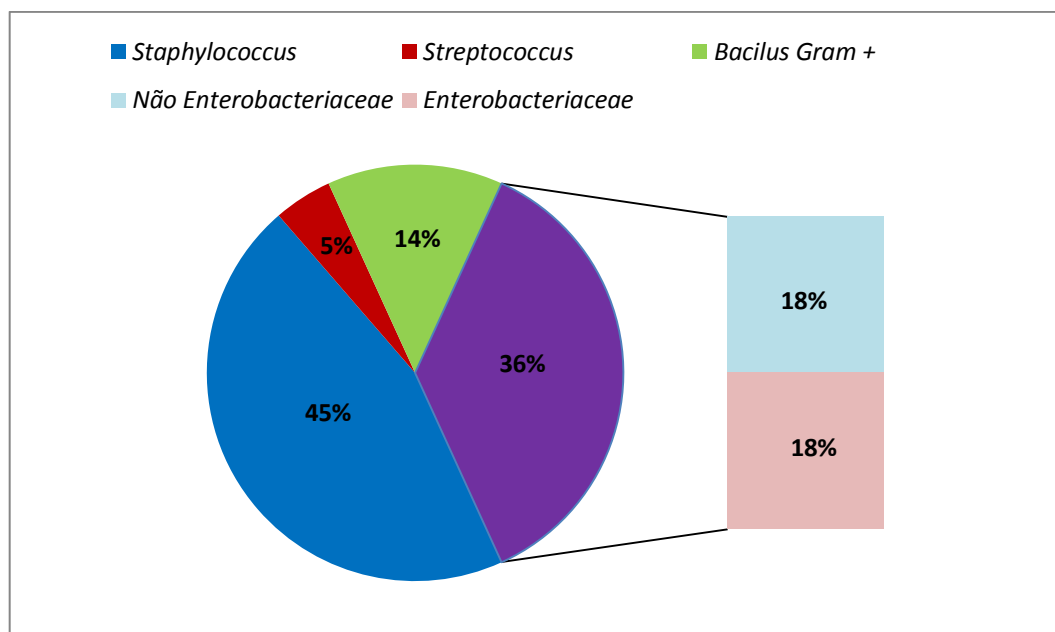


Tabela 8 - Principais isolados bacterianos de animais do Grupo 2

Amostra	Isolado(s) bacteriano(s)
D1	<i>Staphylococcus</i> ; Bacilos +
D2	Negativo
D3	<i>Staphylococcus</i> ; Bacilos +; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Streptococcus</i>
D4	<i>Staphylococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; Não <i>Enterobacteriaceae</i> ;
D5	<i>Staphylococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; Não <i>Enterobacteriaceae</i>
D6	<i>Staphylococcus</i>
D7	<i>Staphylococcus</i>
D8	<i>Staphylococcus</i> ; Não <i>Enterobacteriaceae</i>
D9	<i>Staphylococcus</i>
D10	<i>Staphylococcus</i> ; Bacilos +; <i>Enterobacteriaceae</i>
D11	<i>Staphylococcus</i> ; Não <i>Enterobacteriaceae</i>

Gráfico 2 - Isolados bacterianos de animais do Grupo 2 (percentagem)



2. Identificação da espécie

Das 31 amostras em estudo, foram isolados um total de 22 staphylococci, 12 isolados a partir do grupo 1 e 10 isolados a partir do grupo 2. Foram identificadas as espécies discriminadas nas Tabelas 9 e 10 e nos Gráficos 3 e 4.

Tabela 9 - Espécies de *Staphylococcus* identificadas em animais do Grupo 1

Amostra	Espécie
S2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S8	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
S10.1	<i>Staphylococcus vitulus</i>
S10.2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
S11	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
S13	<i>Staphylococcus aureus</i>
S14	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
S15.2	<i>Staphylococcus aureus</i>
S15.3	<i>Micrococcus luteus</i> *
S16	<i>Staphylococcus capitis</i>

* A amostra 15.3 é um coco de Gram positivo, catalase positivo, e como tal, foi submetido a identificação. No entanto, depois de identificado através de um teste bioquímico, verificou-se que pertence ao género *Micrococcus*, incluído na mesma família, pelo que foi retirado do estudo.

Gráfico 3 - Espécies de *Staphylococcus* identificadas em animais do Grupo 1 (percentagem)

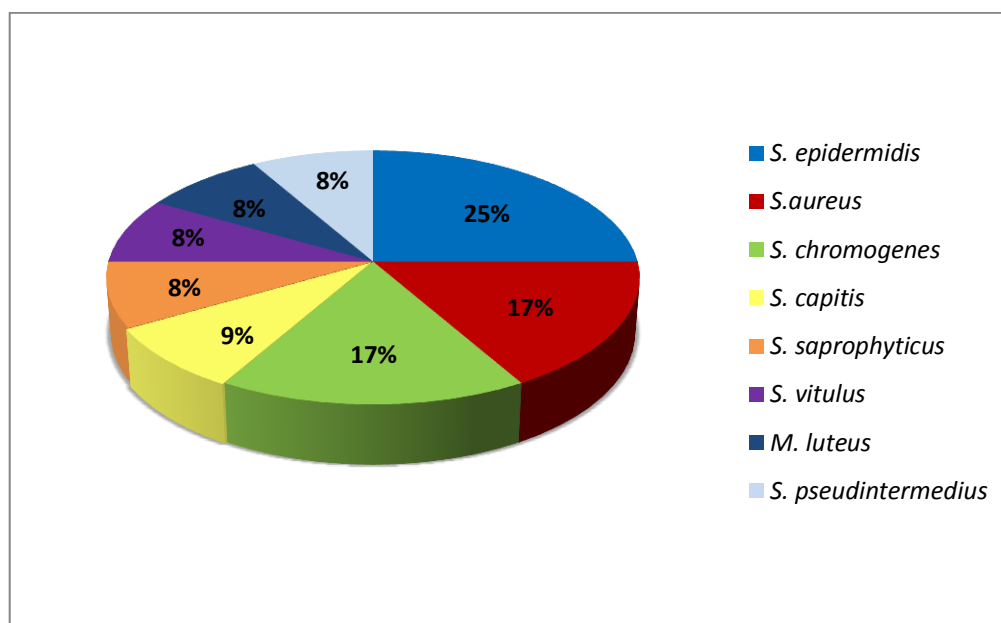
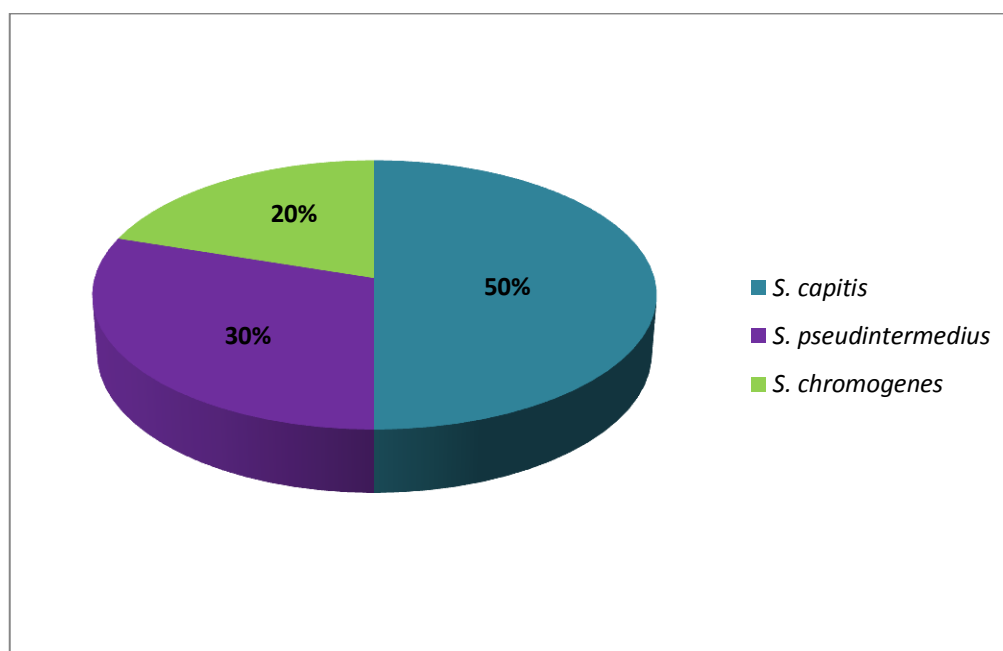


Tabela 10 – Espécies de *Staphylococcus* identificadas em animais do Grupo 2

Amostra	Espécie
D1	<i>Staphylococcus capitis</i>
D3	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
D4	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
D5	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
D6	<i>Staphylococcus capitis</i>
D7	<i>Staphylococcus capitis</i>
D8	<i>Staphylococcus capitis</i>
D9	<i>Staphylococcus capitis</i>
D10	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
D11	<i>Staphylococcus chromogenes</i>

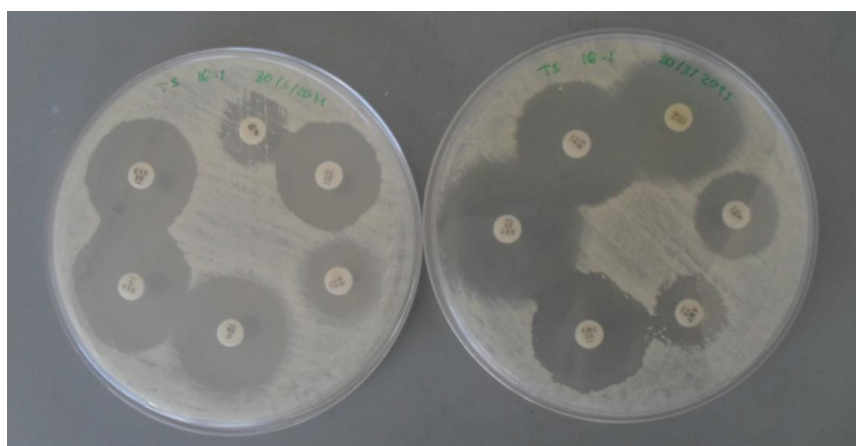
Gráfico 4 - Espécies de *Staphylococcus* identificadas em animais do Grupo 2 (percentagem)



3. Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos

Os staphylococci isolados de ambos os grupos foram submetidos a testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos (Figura 10).

Figura 10 – Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos de *S. capitis*



Os resultados estão apresentados nas Tabelas 11 e 12 e nos gráficos 5 e 6, respectivamente para os Grupos 1 e 2.

Tabela 11 – Perfil de susceptibilidade staphylococci isolados dos animais do Grupo 1

ISOLADOS	P	AMP	AMC	CL	CTX	C	CN	ST	ENR	NA	STX	TE
S2 <i>S.epidermidis</i>	R	R	R	I	I	S	S	S	S	I	S	R
S3 <i>S. epidermidis</i>	R	R	R	R	R	S	S	I	S	R	S	R
S5 <i>S.epidermidis</i>	R	R	R	I	I	S	I	I	R	R	S	S
S8 <i>S. chromogenes</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R
S10.1 <i>S. vitulus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
S10.2 <i>S. chromogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R
S11 <i>S. pseudintermedius</i>	R	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R
S13 <i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
S14 <i>S. saprophyticus</i>	R	I	S	R	I	S	S	S	S	R	S	R
S15 <i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	R
S16 <i>S. capitis</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S

R - Resistente I – Intermédio S - Sensível

O perfil de susceptibilidade do grupo 1 demonstrou que 100% dos staphylococci isolados foram resistentes a pelo menos um grupo de agentes antimicrobianos e 91% foram-no a pelo menos dois. Verificou-se ainda que 36,4% dos isolados foram resistentes a 5 grupos de agentes antimicrobianos e 18% a 6 dos 7 grupos testados.

Por sua vez, apenas um agente antimicrobiano se mostrou eficaz contra 100% dos isolados do grupo 1, como demonstrado no Gráfico 5.

O ácido nalidíxico, a penicilina, a ampicilina e a tetraciclina foram os antibióticos que apresentaram maior taxa de resistências entre os isolados dos animais do grupo 1.

Gráfico 5 – Nº de isolados de animais do Grupo 1 resistentes aos vários agentes antimicrobianos testados

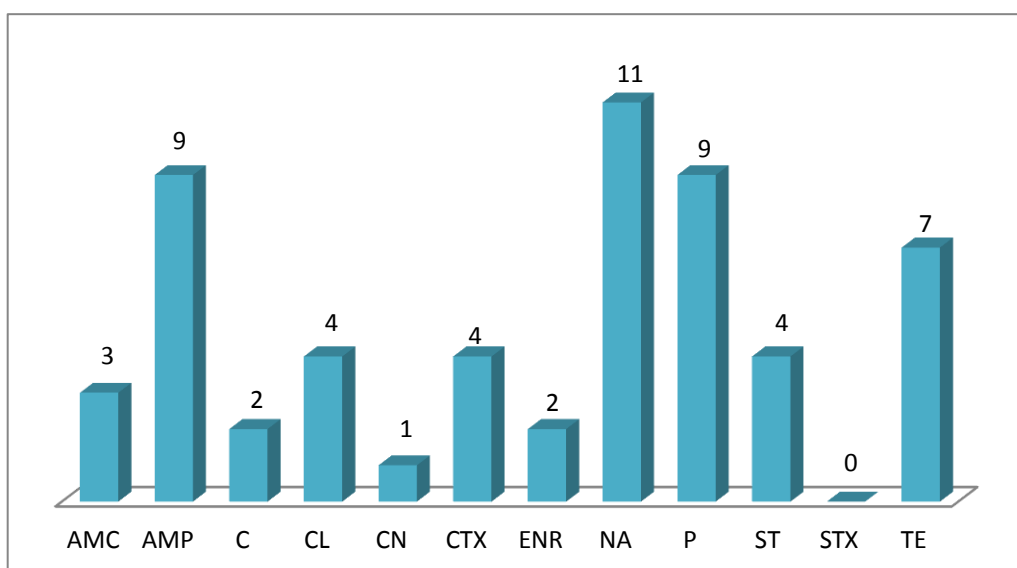


Tabela 12 – Perfil de susceptibilidade de staphylococci isolados de animais do Grupo 2

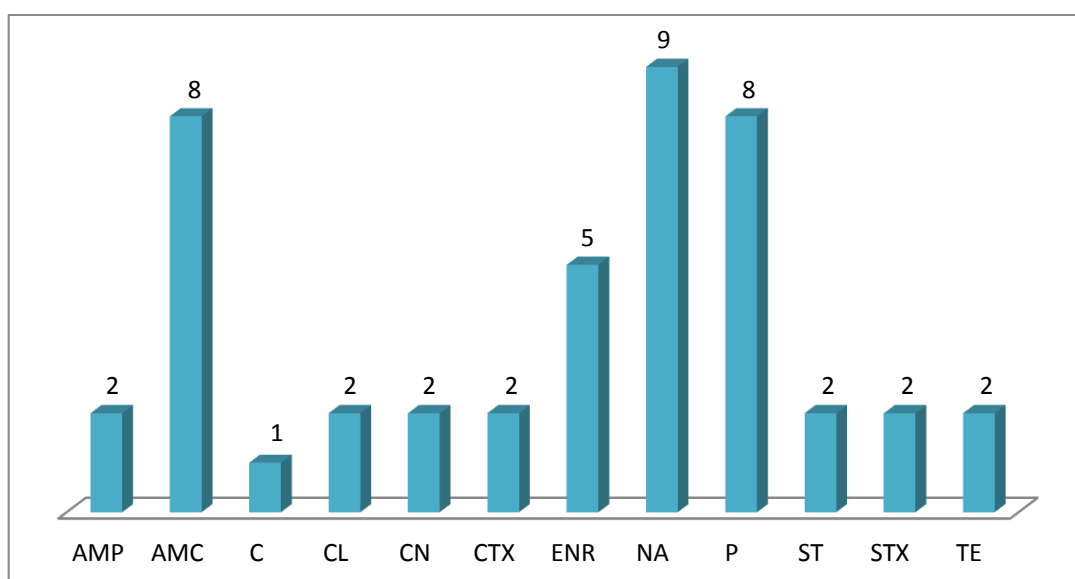
ISOLADOS		P	AMP	AMC	CL	CTX	C	CN	ST	ENR	NA	STX	TE
D1	<i>S. capitis</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
D3	<i>S. pseudintermedius</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
D4	<i>S. pseudintermedius</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
D5	<i>S. pseudintermedius.</i>	R	R	S	R	R	I	S	S	S	I	S	I
D6	<i>S. capitis</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
D7	<i>S. capitis</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
D8	<i>S. capitis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
D9	<i>S. capitis</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
D10	<i>S. chromogenes</i>	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R
D11	<i>S. chromogenes.</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S

R - Resistente I – Intermédio S - Sensível

O perfil de susceptibilidade dos isolados de animais do Grupo 2 demonstrou que, também neste grupo, 100% dos staphylococci isolados eram resistentes a pelo menos um grupo de antimicrobianos e 90% a pelo menos 2 grupos. Verificou-se ainda que 40% dos isolados foram resistentes a pelo menos 3 grupos, 10% foram-no a 5 grupos e outros 10% a 6 dos 7 grupos testados. Os antibióticos com menor eficácia foram o ácido nalidíxico a penicilina e a ampicilina, embora uma grande percentagem dos isolados também tenha sido resistente à tetraciclina.

Nenhum dos agentes antimicrobianos foi 100% eficaz contra todos os representantes do grupo 2, como demonstrado no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Nº de isolados de animais do Grupo 2 resistentes aos vários agentes antimicrobianos testados



Após análise estatística dos dados respectivos à susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos staphylococci isolados, não se verificou qualquer correlação significativa entre os dois grupos, com excepção da tetraciclina. Os microrganismos do grupo 1 (isolados de pele saudável), foram menos susceptíveis ao fármaco em questão do que os isolados do grupo 2 (lesões dermatológicas) com $p=0,025247$.

4. Capacidade de produção de biofilme

Os 21 staphylococci identificados foram submetidos a um protocolo de detecção da capacidade de produção de biofilme (Figuras 11 e 12). Verificou-se que 55% dos microrganismos isolados de animais do Grupo 1 e 20% dos microrganismos isolados de animais do Grupo 2 expressaram biofilme *in vitro*, como discriminado nas Tabelas 13 e 14 e no Gráfico 7.

Tabela 13 – Capacidade de produção de biofilme por staphylococci isolados de animais do Grupo 1

Amostra	Microrganismo	Biofilme
S2	<i>S. epidermidis</i>	Positivo
S3	<i>S. epidermidis</i>	Positivo
S5	<i>S. epidermidis</i>	Positivo
S8	<i>S. chromogenes</i>	Negativo
S10.1	<i>S. vitulus</i>	Negativo
S10.2	<i>S. chromogenes</i>	Negativo
S11	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
S13	<i>S. aureus</i>	Positivo
S14	<i>S. saprophyticus</i>	Positivo
S15	<i>S. aureus</i>	Positivo
S16	<i>S. capitis</i>	Negativo

Figura 11 – *S. capitis* em meio Vermelho de Congo, negativo à produção de biofilme (original)

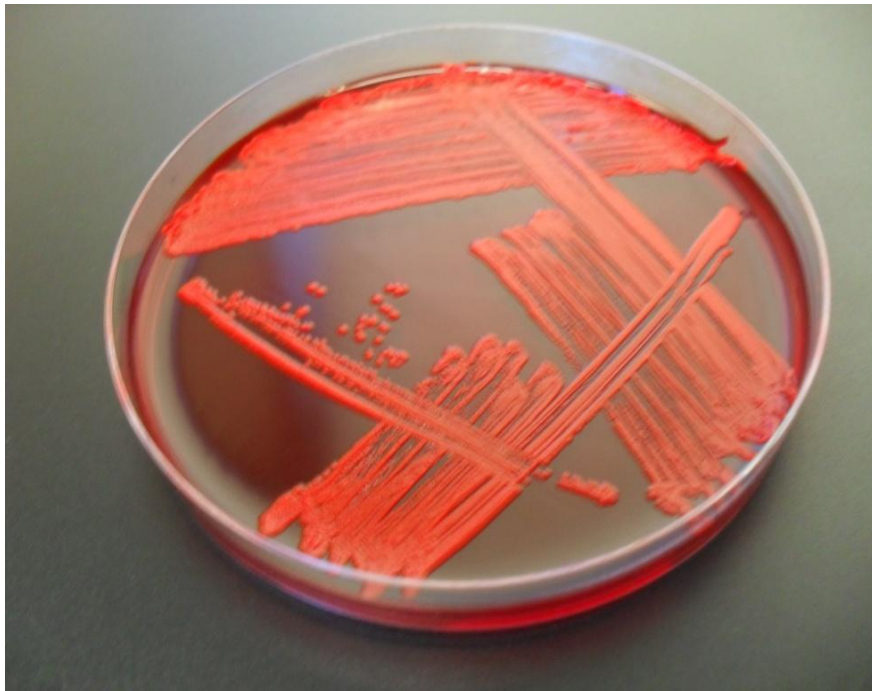


Figura 12 – *S. aureus* em meio Vermelho de Congo, positivo à produção de biofilme (Original)

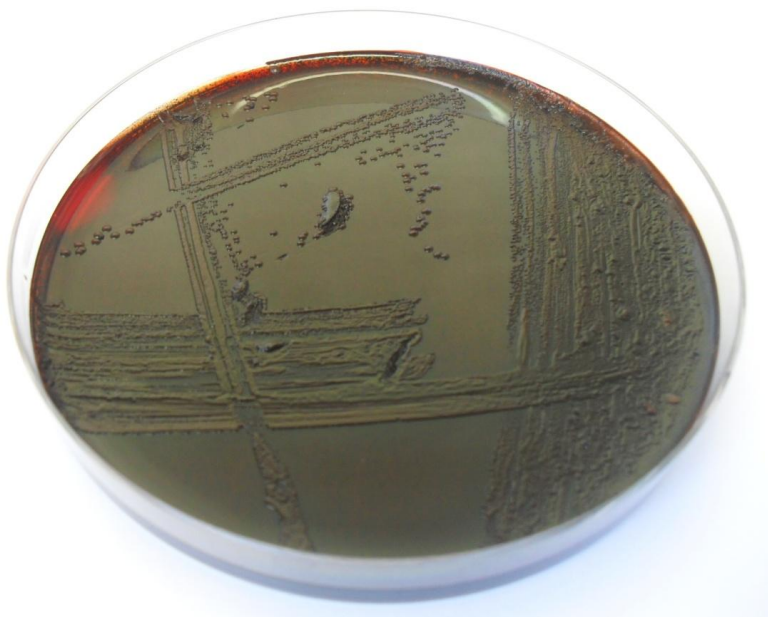
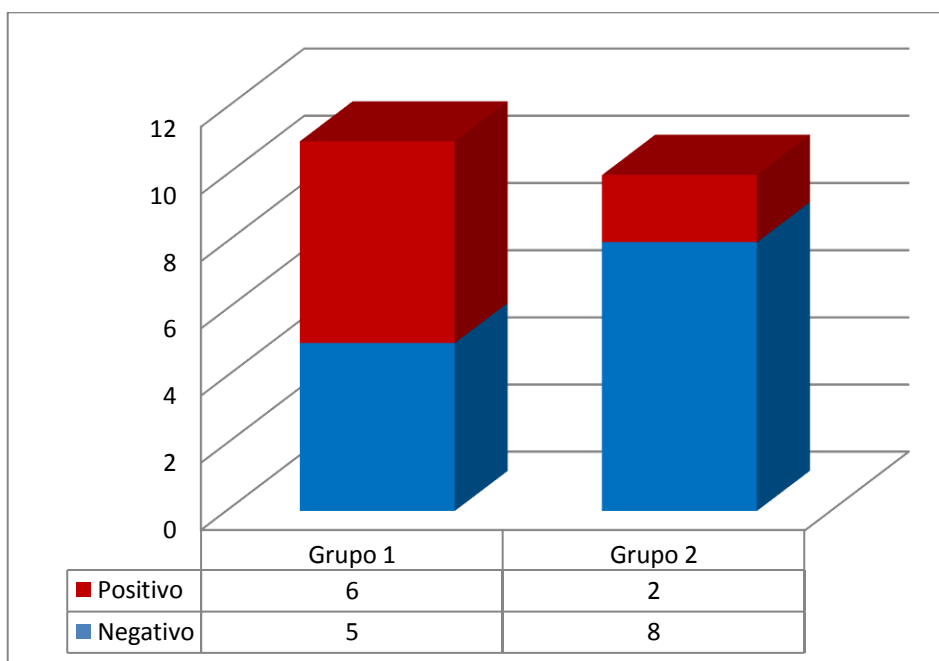


Tabela 14 – Capacidade de produção de biofilme por staphylococci isolados de animais do Grupo 2

Amostra	Microrganismo	Biofilme
D1	<i>S. capitis</i>	Negativo
D3	<i>S. pseudintermedius</i>	Positivo
D4	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
D5	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
D6	<i>S. capitis</i>	Negativo
D7	<i>S. capitis</i>	Negativo
D8	<i>S. capitis</i>	Negativo
D9	<i>S. capitis</i>	Negativo
D10	<i>S. chromogenes</i>	Positivo
D11	<i>S. chromogenes</i>	Negativo

Gráfico 7 – Nº de isolados produtores de biofilme nos animais dos Grupos 1 e 2



Após análise estatística dos dados no que respeita à capacidade de produção de biofilme nos dois grupos testados, verificou-se uma correlação significativa ($p=0,0455$), tendo os staphylococci isolados de pele saudável revelado uma capacidade superior para *in vitro* expressar biofilme do que os microrganismos do mesmo género isolados de lesões dermatológicas.

5. Relação entre a produção de biofilme e a resistência antimicrobiana

Foram comparados os dois factores de virulência testados (capacidade de produção de biofilme e antibiorresistência) dos staphylococci de ambos os grupos, como discriminado nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Capacidade de produção de biofilme e respectivas resistências: Grupo 1

Amostra	Microrganismo	Biofilme	Resistências
S2	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	AMC; AMP; CL; CTX; NA; P; TE
S3	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	AMC; AMP; CL; CTX; NA; P; S; TE
S5	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	AMC; AMP; CL; CN; CTX; ENR; NA; P; S
S8	<i>S. chromogenes</i>	Negativo	AMP; NA; P; TE
S10.1	<i>S. vitulus</i>	Negativo	NA
S10.2	<i>S. chromogenes</i>	Negativo	NA; TE
S11	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	AMP, C; NA; P; S; TE
S13	<i>S. aureus</i>	Positivo	AMP; ENR; NA; P
S14	<i>S. saprophyticus</i>	Positivo	AMP; CL; CTX; NA; P; TE
S15	<i>S. aureus</i>	Positivo	AMP; C; NA; P; S; TE
S16	<i>S. capitis</i>	Negativo	AMP; NA; P;

Tabela 16 – Capacidade de produção de biofilme e respectivas resistências: Grupo 2

Amostra	Microrganismo	Biofilme	Resistências
D1	<i>S. capitis</i>	Negativo	AMC; AMP; ENR; NA; P;
D3	<i>S. pseudintermedius</i>	Positivo	AMP; NA; P; SXT
D4	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	AMC; AMP; CL; CN; CTX; ENR; NA; P; S; SXT
D5	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	AMP; C; CL; CTX; NA; P; TE
D6	<i>S. capitis</i>	Negativo	AMP; ENR; NA; P
D7	<i>S. capitis</i>	Negativo	CN; ENR; NA
D8	<i>S. capitis</i>	Negativo	NA
D9	<i>S. capitis</i>	Negativo	AMP; ENR; NA; P
D10	<i>S. chromogenes</i>	Positivo	AMP; P; S; TE
D11	<i>S. chromogenes</i>	Negativo	AMP; NA; P

Após a realização da análise estatística dos dados, verificou-se uma correlação positiva entre a capacidade de produção de biofilme e a resistência a vários dos antimicrobianos testados pelos staphylococci em ambos os grupos, nomeadamente penicilinas, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas, como exposto na Tabela 17.

Tabela 17 – Correlação entre a produção de biofilme e as resistências a agentes antimicrobianos

Comparação	Relação Grupo 1	Relação grupo 2	Total
Biofilme – AMC	ns (p=0,083265)	ns (p=1)	ns (p=0,256839)
Biofilme – AMP	ns (p=0,083265)	s (p =0,014306)	s (p=0,0027)
Biofilme – P	ns (p=0,083265)	s (p =0,014306)	s (p=0,0027)
Biofilme – CL	ns (p=0,157299)	ns (p=1)	ns (p=0,414216)
Biofilme – CTX	ns (p=0,157299)	ns (p=1)	ns (p=0,414216)
Biofilme – C	ns (p=0,10247))	ns (p=0,563703)	ns (p=0,095581)
Biofilme – CN	s (p=0,025347)	ns (p=1)	ns (p=0,095581)
Biofilme – ST	s (p=0,317311)	ns (p=1)	ns (p=0,414216)
Biofilme – ENR	s (p=0,045500)	ns (p=0,256839)	ns (p=0,763025)
Biofilme – NA	s (p=0,025347)	s (p=0,019631)	s (p=0,0013410)
Biofilme – SXT	s (p=0,014306)	ns (p=1)	s (p= 0,033895)
Biofilme – TE	ns (p=0,654721)	ns (p=1)	ns (p=0,705457)

s- Significativo ns – Não significativo

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objectivo estudar a capacidade de formação de biofilme de 21 staphylococci isolados da superfície cutânea de cães, presentes à consulta no HVR entre 13 de Setembro de 2010 e 20 de Março de 2011, agrupados em dois grupos distintos (animais com dermatite e sem dermatite), e relacioná-la com a sua resistência a vários agentes antimicrobianos. Pretendeu-se ainda fazer a comparação entre os dois grupos em relação aos parâmetros investigados. É importante referir que se pretendia que o grupo 2 fosse composto por pelo menos 20 animais (para aumentar a representatividade da amostra), mas tal não foi possível, uma vez que a casuística de dermatite no período anteriormente referido não foi muito expressiva e que a maioria dos animais que comparecia às consultas já se encontrava sob tratamento antibiótico.

As amostras do grupo 1 foram colhidas das zonas glabras (axilas e virilhas), zonas corporais por norma mais húmidas e quentes e consequentemente com maior concentração bacteriana, o que vai aumentar significativamente a probabilidade de isolamento bacteriano. Além disso trata-se de zonas com menos pêlo, o que diminui a probabilidade de contaminação por microrganismos fecais e ambientais.

Quanto ao grupo 2 escolhidas as feridas que se apresentavam mais exsudativas, de modo a aumentar a probabilidade de isolamento bacteriano.

O meio utilizado para transportar as amostras até ao laboratório foi o meio Amies, meio semi-sólido sem nutrientes, que retarda as reacções enzimáticas auto-destrutivas nas células e inibe os efeitos oxidativos tóxicos.

Foram estudados 31 isolados, 20 pertencentes ao grupo 1 – animais sem dermatite, e 11 pertencentes ao grupo 2 - animais com dermatite.

No grupo 1 foram isolados maioritariamente bacilos de Gram negativo (35%) e estafilococos (35%), bem como alguns estreptococos (16%) e bacilos de Gram positivo (14%), o que está de acordo com o descrito como microbiota normal do hospedeiro, composta habitualmente por *Acinetobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e, mais raramente, por *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp. e *Alcaligenes* spp. (Krogh & Kristersens, 1976; Scott et al., 1997).

Segundo os mesmos autores, as espécies de estafilococos mais representativas na microbiota cutânea normal dos canídeos são *S. aureus* e *S. epidermidis*, o que também está de acordo com os resultados obtidos, onde as espécies maioritariamente identificadas foram *S. epidermidis* (25%), *S. aureus* (17%) e *S. chromogenes* (17%). Foram ainda identificadas em menor percentagem *S. capitis* (9%), *S. saprophyticus* (8%), *S. vitulus* (8%) e *S. pseudintermedius* (8%).

No grupo 2 foram isolados maioritariamente estafilococos (45%) e bacilos de Gram negativo (36%) e, esporadicamente, bacilos de Gram positivo (14%) e estreptococos (5%).

As dermatites bacterianas caninas são na sua grande maioria causadas por estafilococos e complicadas por agentes patogénicos secundários, geralmente de Gram negativo, tais como *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli* (Scott et al., 1997), dados que estão em concordância com os resultados obtidos.

O agente bacteriano primário responsável por cerca de 90% das dermatites caninas é *Staphylococcus pseudintermedius* (Hauschild & Wójcik, 2007; Scott et al. 1997; Jasmin, 2005), o que não está completamente de acordo com o estudo realizado, onde *S. pseudintermedius* foi a segunda espécie mais frequentemente identificada (30%), antecedida por *S. capitis* (50%) e seguida por *S. chromogenes* (20%). Possivelmente a baixa amostragem é responsável por este facto, uma vez que 11 amostras não podem ser representativas de uma população de canídeos.

Depois de identificados, os staphylococci isolados foram analisados quanto à susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos, que foram seleccionados por abrangerem os antibióticos de 1ª e 2ª linha mais frequentemente utilizados na prática clínica veterinária, por serem representativos da grande parte dos grupos antimicrobianos existentes e porque a grande maioria das substâncias (excepção apenas para o ácido nalidíxico) apresenta actividade contra o género *Staphylococcus*.

- Penicilina G – Penicilina natural de primeira geração, pertencente ao grupo dos beta-lactâmicos, eficaz contra bactérias de gram positivo aeróbias e anaeróbias, mas de acção limitada contra bactérias de gram negativo e produtoras de beta-lactamases. Actuam inibindo a síntese dos mucopéptidos da parede celular bacteriana (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Ampicilina – Aminopenicilina semi-sintética, pertencente ao grupo dos beta-lactâmicos, com espectro de acção semelhante à penicilina G, mas também eficaz contra bactérias de gram negativo como *E. coli*, *Klebsiella* e *Haemophilus*. Actua inibindo a síntese da parede celular bacteriana tal como os restantes representantes do grupo. Menos eficaz contra bactérias anaeróbias que as penicilinas naturais (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Amoxicilina associada ao ácido clavulânico – A amoxicilina é também uma aminopenicilina semi-sintética, que quando associada a uma substância inibidora das beta-lactamases como o ácido clavulânico tem alta eficácia antibacteriana, inclusivamente contra géneros mencionados anteriormente como resistentes (produtores de beta-lactamases). Não é eficaz no tratamento de *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp. (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Cefalexina – Cefalosporina de 1ª geração, pertencente ao grupo dos beta-lactâmicos eficaz contra bactérias de gram positivo como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., mas de actividade limitada contra bactérias de gram negativo. Actua inibindo a

síntese da parede celular das bactérias susceptíveis (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).

- Cefotaxima – Cefalosporina de 3ª geração, pertencente ao grupo dos beta-lactâmicos, eficaz contra bactérias de gram positivo, embora em menor grau que as cefalosporinas de 1ª geração. É em contrapartida eficaz contra bactérias de gram negativo como *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp., bem como contra bactérias anaeróbias. Tem o mesmo mecanismo de acção que os restantes representantes do grupo (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Cloranfenicol – Pertencente ao grupo dos fenicóis, é um antibiótico bacteriostático muito eficaz contra uma vasta gama de bactérias de gram positivo e negativo. A sua utilização é no entanto proibida em vários países uma vez que tem efeitos adversos graves, podendo provocar, em pequenas doses, anemia aplásica reactiva em indivíduos susceptíveis. Na União Europeia é estritamente proibida a sua utilização em animais destinados a consumo humano. Actua ligando-se à subunidade ribossomal 50s das bactérias susceptíveis (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Estreptomicina – Antibiótico bacteriostático (nalgumas situações pode ser bactericida) pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, que inibe a síntese proteica nas bactérias susceptíveis, ligando se à subunidade ribossomal 30s. Tem actividade contra um vasto leque de bactérias de gram positivo e de gram negativo como *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Mycoplasma* spp.. Apresenta actividade mínima contra anaeróbios (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Gentamicina - Antibiótico semelhante à estreptomicina, pertencente também ao grupo dos aminoglicosídeos. Actua, como todos os representantes do grupo através de ligação à subunidade ribossomal 30s, inibindo a síntese proteica. Tem actividade preferencial contra as bactérias de gram negativo e algumas de gram positivo, tal como o outro representante do grupo anteriormente descrito. São ambos nefrotóxicos, devendo ser utilizados apenas em situações em que outros antimicrobianos menos nocivos se mostram ineficazes. Actividade limitada contra anaeróbios, fungos e vírus (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Ácido nalidíxico – Antibiótico bactericida, pertencente ao grupo das quinolonas. Actua promovendo a síntese de proteínas tóxicas, ao estimular o RNA. Actua unicamente contra bactérias de gram negativo (López & Camberos, 2006).
- Enrofloxacina – Antibiótico bactericida pertencente ao grupo das fluorquinolonas. Pensa-se que actua inibindo a síntese de DNA bacteriano ao ligar-se à enzima DNA-girase. Tem actividade óptima contra a maioria das bactérias de gram negativo incluindo a maioria das estirpes de *E.coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Proteus* spp. Alguns

microrganismos de gram positivo são igualmente susceptíveis incluindo *Staphylococcus* spp. (mesmo os produtores de penicilases e os meticilina resistentes). Tem actividade limitada contra *Streptococcus* spp. e anaeróbios (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).

- Sulfametoxazol/trimetoprim – As sulfonamidas são agentes antimicrobianos bacteriostáticos, mas a sua associação com o trimetoprim é bactericida. As sulfonamidas potenciadas têm um amplo espectro de actividade contra bactérias de gram positivo e de gram negativo incluindo *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bordetella* spp., *Clostridium* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Pasteurella* spp. e *Klebsiella* spp. Também eficaz no tratamento de coccidiose em cães e gatos. Não deve ser utilizado em cães com alterações hepáticas ou do hemograma. Actua inibindo enzimas que intervêm na formação do ácido fólico bacteriano (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).
- Tetraciclina - As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos, de amplo espectro, eficazes contra bactérias de gram positivo e em menor grau contra bactérias de gram negativo. Actuam ligando-se às subunidades ribossomais 30s e 50s e alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática das bactérias susceptíveis. São muito eficazes no tratamento de infecções por protozoários (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006).

Nos animais do grupo 1, todos os isolados se mostraram resistentes a pelo menos um grupo de agentes antimicrobianos, e o antibiótico menos eficaz foi o ácido nalidíxico, ao qual 100% dos representantes foram resistentes. Uma vez que esta quinolona actua exclusivamente contra bactérias de Gram negativo (López & Camberos, 2006), os resultados obtidos eram expectáveis. Em contrapartida, o outro representante do grupo (enrofloxacin) apresentou taxas de resistência baixas (18%) o que é facilmente explicado pelo espectro de acção alargado do fármaco e pela sua reduzida tendência para as resistências (López & Camberos, 2006; Plumb, 2008).

Os microrganismos isolados de animais do grupo 1 também demonstraram níveis de resistência muito elevados (82%) à penicilina G e à ampicilina, antibióticos pertencentes ao grupo das penicilinas. Apesar de serem antibióticos cuja acção preferencial incide sobre bactérias de Gram positivo (Plumb, 2008; López & Camberos, 2006), cerca de 80% dos representantes do género *Staphylococcus* em todo o mundo são resistentes a esses agentes, devido à presença de penicilinases, que destroem o seu anel beta-lactâmico (Tavares, 2000; Murray et al., 2006; López & Camberos, 2006, May, 2006; DeBoer, 2006).

A amoxicilina associada ao ácido clavulânico, o outro representante do grupo das penicilinas, mostrou-se, por sua vez, bastante mais eficaz. Apesar de apresentar um espectro de acção muito semelhante aos restantes antimicrobianos do grupo, verificou-se apenas 27% de resistências por parte dos isolados em estudo. O ácido clavulânico,

molécula que se liga irreversivelmente às beta-lactamases, é provavelmente o responsável por essa diferença, uma vez que, como anteriormente referido, é a inativação por essas enzimas a maior causa das resistências aos antibióticos beta-lactâmicos por parte dos estafilococos (Harvey & Hunter, 1999; May, 2006; Murray et al., 2006).

Quanto às cefalosporinas de 1ª e 3ª geração (cefalexina e cefotaxima), os isolados apresentaram um grau de resistência moderada (36%). As cefalosporinas foram inicialmente desenvolvidas para actuar contra infecções estafilocócicas resistentes às penicilinas, mas rapidamente desenvolveram resistência também a estes fármacos, através de mecanismos muito semelhantes como a permeabilidade reduzida, a inativação enzimática e a ausência de proteínas fixadoras (Tavares, 2000; Murray et al., 2006; López & Camberos, 2006).

Quanto ao grupo dos aminoglicosídeos, os staphylococci isolados de animais do grupo 1 foram resistentes em 36% à estreptomicina e em 9% à gentamicina.

A indução de resistências neste grupo é relativamente rápida, pelo que a diferença nas percentagens de eficácia dos dois fármacos estudados deve-se, provavelmente, ao facto de a gentamicina ser uma molécula mais recente, não havendo ainda tantas estirpes resistentes (López & Camberos, 2006; Plumb, 2008).

Os representantes dos isolados de animais do grupo 1 também apresentam uma grande percentagem de resistência à tetraciclina (64%). Há evidências de resistência adquirida, mediada por plasmídeos, por parte dos estafilococos. Manifesta-se através de alterações na ligação ribossomal e aumento da sua taxa de saída, através de bombas de efluxo especializadas (López & Camberos, 2006; Plumb, 2008; DeBoer, 2006; May, 2006).

Quanto ao cloranfenicol, 18% dos microrganismos estudados foram resistentes a esta molécula. Apesar de terem sido reportadas algumas resistências por transferência plasmídica, o largo espectro de acção e o facto de ser um fármaco com efeitos secundários graves, não sendo muito utilizado, pode explicar sua baixa taxa de resistências (López & Camberos, 2006).

Finalmente o sulfametoxazol associado ao trimetoprim foi o fármaco que se mostrou mais eficaz contra os estafilococos isolados de canídeos do grupo 1, não havendo nenhum microrganismo resistente. Embora as sulfonamidas apresentem resistências cromossómicas e mediadas por plasmídeos, a associação com o trimetoprim, além de potenciar o efeito terapêutico, parece evitar as resistências cruzadas com o resto dos antibacterianos do grupo (López & Camberos, 2006; May, 2006).

Nos estafilococos isolados de cães do grupo 2 – animais com dermatites – os resultados de susceptibilidade a agentes antibacterianos obtidos foram semelhantes aos isolados do grupo 1. Todos os microrganismos foram resistentes a pelo menos um grupo de agentes antimicrobianos e o ácido nalidíxico, a penicilina e a ampicilina mostraram taxas de resistência muito elevadas (90%, 80% e 80% respectivamente). Por sua vez as cefalosporinas (cefalexina e cefotaxima), os aminoglicosídeos (estreptomicina e

gentamicina), a amoxicilina associada ao ácido clavulânico e o sulfametoxazol associado ao trimetoprim apresentaram taxas de resistência moderadas (20%). Estes resultados confirmam que os representantes do grupo das penicilinas não devem ser prescritos para o tratamento de dermatites, devido às elevadas taxas de resistência que o género *staphylococci* apresenta, devido à expressão de penicilinases, já anteriormente referida, excepto quando associados ao ácido-clavulânico (Murray et al., 2006; López & Camberos, 2006; Harvey & Hunter, 1999; May, 2006).

Os resultados demonstram ainda que os agentes antimicrobianos de primeira linha geralmente prescritos – amoxicilina + ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração e sulfonamidas potenciadas (Scott et al., 1997; Jasmin, 2005, Locke & Harvey, 1992, May, 2006) – permanecem eficazes contra a grande maioria dos agentes patogénicos da doença em causa, podendo ser prescritos empiricamente. No entanto a percentagem de resistências verificada (20%) confirma a tendência crescente para a multirresistência por parte do género *staphylococci* citada por alguns autores (Hauschild & Wójcik, 2007; Ganieère, Madaille & Magnion, 2005; Rubin, Ball & Chirino-Trejo, 2011), o que num futuro próximo se pode tornar bastante problemático.

Foi o cloranfenicol o antimicrobiano mais eficaz nos isolados do grupo 2, com uma taxa de susceptibilidade de 90%, mas como anteriormente referido, apresenta reacções secundárias graves, não sendo utilizado (López & Campero, 2006). Quanto à enrofloxacin, e ao contrário do que sucedeu no grupo 1, apresentou uma taxa de resistência elevada (50%). No entanto, e após análise estatística dos dados, a diferença foi considerada não significativa ($p = 0,08326$).

Finalmente a tetraciclina apresentou nos isolados do grupo 2 uma taxa de resistência baixa (20%), ao contrário do que se verificou no grupo 1, onde a taxa foi de 64%. Após análise estatística dos dados verificou-se uma correlação positiva entre os dois grupos no que diz respeito a este fármaco ($p=0,025347$). Os estafilococos isolados de pele saudável são mais resistentes à tetraciclina do que os isolados de dermatites. Isto corrobora as observações de que a resistência ao fármaco em causa (mediada por plasmídeos) se encontra muito disseminada, mesmo entre microrganismos não patogénicos que não sofrem qualquer tipo de selecção (López & Camberos, 2006).

Os resultados da susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados de ambos os grupos de animais confirmam que o problema da multirresistência por parte do género *Staphylococcus* não pode ser ignorado, uma vez que 90% dos isolados de ambos os grupos foram resistentes a pelo menos 2 grupos de princípios activos antimicrobianos e 38% a pelo menos 5 dos 7 grupos testados.

Após análise dos perfis de antibiorresistência os *staphylococci* isolados foram submetidos a um protocolo de detecção da capacidade de produção de biofilme. Oito dos 21 isolados

foram considerados positivos (38,1%), o que está de acordo com a elevada tendência deste género para expressar este factor de virulência (Otto, 2008).

Nos isolados dos cães do grupo 1 (com pele saudável), 55% dos estafilococos produziram biofilme, enquanto nos isolados dos animais do grupo 2 (com dermatite) esta percentagem foi de apenas 20%. Após análise estatística dos dados verificou-se uma correlação positiva entre os 2 grupos ($p=0,0455$) com uma maior tendência dos isolados de pele saudável para formar biofilme. No entanto, o número de isolados de cada um dos grupos de animais é demasiado pequeno para que se possam inferir conclusões. Foi recentemente provada a existência de biofilmes em bactérias isoladas a partir de feridas crónicas (Houari & Martino, 2007; Oliveira et al., 2009; Cooper, 2010; Cooper, Jenkins & Rowlands, 2011; Zanatta & Rosing, 2007).

Após análise estatística dos dados recolhidos neste estudo ficou ainda patente a correlação positiva entre a produção de biofilme e a resistência por parte dos staphylococci a vários grupos antimicrobianos, nomeadamente, penicilinas, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas. Embora o número de amostras não seja suficiente para fornecer conclusões sólidas, os dados obtidos sugerem que a elevada taxa de permuta genética existente no interior dos biofilmes aumenta a probabilidade de aquisição de genes de resistência nos staphylococci capazes de expressar esse factor de virulência. A estrutura sólida e a proximidade entre as células bacterianas providenciam um ambiente ideal para a transferência genética horizontal, que pode levar à disseminação de genes de resistência antibiótica. A conjugação ocorre a uma taxa muito maior no biofilme que entre células bacterianas de vida livre (Roberts & Mullany, 2010; Donlan, 2002; Donlan & Costerton, 2002).

Importa ainda referir que para os staphylococci produtores de biofilme a resistência aos agentes antimicrobianos investigados foi muito provavelmente subestimada, uma vez que as análises de susceptibilidade antimicrobiana foram realizadas em células bacterianas de vida livre e não no contexto do biofilme em que possivelmente se encontrariam *in vivo*. A estrutura natural do biofilme e a actividade fisiológica dos microrganismos nele envolvidos confere uma resistência inerte às substâncias antimicrobianas (Donlan & Costerton, 2002). Entre os vários mecanismos responsáveis por esta resistência encontramos a difusão retardada dos agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, o decréscimo da disponibilidade de oxigénio e nutrientes acompanhado por uma actividade metabólica alterada e a formação de células persistentes (Anderson & O'Toole, 2008). Estes factores, sozinhos ou combinados, explicam a sobrevivência dos biofilmes numa serie de situações (Lewis, 2001).

Uma bactéria envolvida por biofilme pode ser até 1000 vezes mais resistentes a um antibiótico, que o mesmo microrganismo com crescimento livre (Davey & O'Toole, 2000).

CONCLUSÃO

Staphylococcus é um género bacteriano ubiqüitário, também presente na pele dos canídeos. Geralmente é inócuo mas sob determinadas condições pode-se tornar patogénico, expressando factores de virulência como multirresistência antimicrobiana e produção de biofilme.

Este estudo analisou 31 amostras de pele de canídeo divididas em dois grupos (animais com e sem dermatite) com o objectivo de avaliar o perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos e a capacidade de produção de biofilme pelos staphylococci identificados. As espécies de staphylococci maioritariamente identificadas foram *S. epidermidis* (25%), *S. aureus* (17 %) e *S. chromogenes* (17%) no grupo 1 e *S. capitis* (50%), *S. pseudintermedius* (30%) e *S. chromogenes* (20%) no grupo 2.

Não foram observadas diferenças significativas na susceptibilidade antimicrobiana entre os dois grupos. Cerca de 90% dos representantes de ambos foram resistentes a pelo menos 2 grupos de agentes antimicrobianos, confirmando a prevalência de resistências face à penicilina G, à ampicilina e à tetraciclina, evidenciada por outros autores para este género bacteriano.

Uma grande parte das estirpes analisadas foi susceptível aos agentes antimicrobianos de 1ª linha geralmente prescritos no tratamento de infecções estafilocócicas como por exemplo amoxicilina + ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª geração, sulfonamidas potenciadas e fluorquinolonas, o que demonstra que podem continuar a ser tratadas empiricamente na maioria dos casos. No entanto a multirresistência também foi um achado comum. Cerca de 40% dos staphylococci analisados foram resistentes a 5 dos 7 grupos antimicrobianos testados o que é bastante preocupante, tendo em conta o potencial zoonótico do género. Os ciclos repetidos de antibioterapia a que os animais com dermatite são submetidos e o uso indiscriminado de antibióticos pode justificar parte dos resultados, mas o facto de encontrarmos multirresistência em isolados de pele saudável demonstra que esse factor de virulência está bastante disperso mesmo entre animais saudáveis, o que pode sugerir transferência horizontal de genes de resistência.

Neste estudo foi ainda demonstrada a capacidade de staphylococci isolados de superfície cutânea, quer saudável quer lesionada, em formar biofilme. Cerca de 38% dos isolados foram positivos a este factor de virulência com uma prevalência dos microrganismos isolados de pele saudável (55%) sobre os isolados de dermatites (20%).

Foi ainda sugerida uma correlação positiva entre a produção de biofilme por parte dos staphylococci e a resistência a vários grupos antimicrobianos. Staphylococci capazes de produzir biofilme são mais resistentes ao grupo das penicilinas, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas, o que poderá estar relacionado com o ambiente propício à permuta de genes de resistência que se verifica dentro do biofilme, entre outros factores.

BIBLIOGRAFIA

- Adams J.L. & Mclean, R.J.C. (1999). Impact of rpoS deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Applications in Environmental Microbiology*, 65:4285-4287.
- Ahmadi, M., Javadi, S. & Maroofi, S. (2008). Prevalence of coagulase-positive staphylococci in the skin of dogs; antibacterial resistance and plasmid profile of the isolates. *Companion Clinical Pathology*, 18:39-42.
- Anwar, H. Strap, J.L. Chen, K. & Costerton, J.W. (1992). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacilin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36:1208-1214.
- Anderson, G.G. & O'Toole, A. (2008). Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 85-105.
- Aysel, U.G., Ceylan, O. (2003). Occurrence of resistance to antibiotics, metals and plasmid in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Archives of Medical Research*, 34(2):130-136.
- Boost, M. V., O'Donoghue, M. M. & Siu, K. H. G. (2007). Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(7), 731-733.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13, 20-26.
- Bryers, J.D. (2008). Medical Biofilms. *Biotechnological bioengineering*, 100(1):1-18.
- Characklis, W.G. & Marshall, K.C. (1990). *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc. (New York, NY).
- Cheung, G.Y.C., Wang, R., Khan, B.A., Sturdevant, D.E. & Otto, M. (2011). Role of the Accessory Gene Regulator *agr* in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *American Society for Microbiology, Infection and Immunity*, 79(5), 1927-1935.
- Cooper, R. (2010). Biofilms and wounds: much ado about nothing? *Wounds UK* 6(4).
- Cooper, R., Jenkins, L. & Rowlands, R. (2011). Inhibition of biofilms through the use of manuka honey. *Wounds UK* 7(1).
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M.K. & Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of Microbiology*, 41:435-464.
- Costerton, J.W. & Lappin-Scott, H.M. (1995). Introduction to microbial biofilms. *Microbial Biofilms*, Cambridge University Press. (pp. 1-11).
- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A., Guardabassi, L. (2011). Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats in a teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record* 169, 72.

- Davies, D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton, J.W., Greenberg E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilme. *Science*, 64:3486-3490.
- Davey, M.E. & O'Toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64, 847-867.
- DeBoer, D.J. (2006). Canine staphylococcal pyoderma. *US companion animal health*, 26-28.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1569-1573.
- Donlan, R. M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15, 167-193.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8, 881-890.
- Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, 15, 155-166.
- Ehlers, L.J. & Bouwer, E.J., (1999). RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilme reactor. *Water science technology*, 7:163-171.
- Euzébi, J.P. (2011). List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature-Genus *Staphylococcus*. Acedido em <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> a Jul. 23, 2011.
- Evans, R.D., Alisson, D.G., Brown, M.R.W. & Gilbert, P. (1990). Effects of grow-rate on resistance of gram-negative biofilms to cetrimide. *Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 26:473-478.
- Fey, P.D. & Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilme formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*, 5(6): 917-933.
- Ganieère, J.P., Madaille, C. & Mangion, C. (2005). Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index reproductibility. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156 (7), 382-385.
- Ghigo, J-M. (2001). Natural Conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412: 442-445.
- Gomes, M.J.P. (2011). Gênero *Staphylococcus* spp. *Bacteriologia Clínica Veterinária, Área de Bacteriologia, UFRGS*.
- Gordon, R.J. & Lowy, F.D. (2008). Pathogenesis of Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infection Diseases*, 46:S350-9.

- Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S. & Rankin, S.C. (2008). Screening for skin carriage of methicilin-resistant coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, 19 (3), 142-9.
- Guaguère, É. & Bensignor, E. (2004). *Terapêutica dermatológica del perro*. (pp. 3-10). Masson.
- Guardabassi, L., Schwartz, S. & Jacobson (2004). Transmission of multiple antimicrobial resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary microbiology*, 98, 23-27.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. (2004). Bacterial Biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews: Bacteriology*, 2. (pp. 95-108).
- Harvey, R.G. & Hunter, P.A. (1999). The properties and use of penicilins in veterinary field, with special reference to skin infections in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 10, 177-186.
- Hauschild, T. & Wójcik, A. (2007). Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. *Research in veterinary science*, 82, 1-6.
- Hill, P.B. (2002). *Small Animal Dermatology – a practical guide to the diagnosis and management of skin diseases in dogs and cats*. (pp. 160-176). Butterworth Heinemann.
- Horvarth, S. & Neuber, A. (2007). Management of canine pyoderma. *Small Animal Dermatology, UK Vet*, 12(1).
- Houari, A. & Martino, P. D. (2007). Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilme formation. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 652-656.
- Hoyle, B.D., Williams, L.J. & Costerton, J.W. (1993). Disparate efficacy of tobramycin on Ca^{2+} Mg^{2+} and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infection and Immunity*, 61: 777-780.
- James, G.A., Beaudette L., Costerton J.W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15:257-262.
- Jasmin, P. (2005). *Clinical Handbook of Canine Dermatology*. (2nd edition). Viebrac Animal Health.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. (10^a edição). (pp. 359-366). Guanabara Koogan.
- Kania, S.A., Williamson, N.L., Frank, L.A., Wilkes R.P., Jones, R.D. & Bemis, D.A. (2004). Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *American Journal of Veterinary Research*, 65(9), 1265-1268.
- Krogh, H.V. & Kristenses, S. (1976). A study of skin diseases in dogs and cats. Microflora of the normal skin of dogs and cats. *Nordisk Veterinaermedicin*, 28 (9): 459-463.

- Leonard, F. C. & Markey, B. K. (2008). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *The Veterinary Journal* 175, 27–36.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45: 999-1007.
- Locke, P.H. & Harvey, R.G. (1992). *Manual of Small Animal Dermatology*. British Small Animal Veterinary Association.
- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, M., Guardabassi, L., Sung, J.M.L., Winkler, M., Weiss, R. & Lloyd, D.H. (2007). First report of multiresistant, *mecA* positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases of a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology* 18, 412-421.
- Loeffler, A. & Lloyd, D.H. (2010). Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiology and infection* 138, 595-605.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*, 2010; 2: a000398.
- López, H.S.S. & Camberos L.O. (2006). *Farmacología Veterinaria*. (3ª ed.) MC Grw Hill.
- Lucia, M., Moodley, A., Latronico, F., Giordano, A., Caldin, M., Fondani, A., Guardabassi, L. (2010). Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. *Research Veterinary Science*, doi: 10.1016/j.rvsc.2010.09.014.
- Marshall, K.C. (1976). Interfaces in microbial ecology. *Harvard University Press, Cambridge Mass.* (pp. 44-47).
- May, E.R. (2006). Bacterial skin diseases: current thoughts on pathogenesis and management. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 36 (1), 185-202.
- Medleau, L., Long, R.E., Brown, J. & Miller, W.H. (1986). Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *American Journal of Veterinary Research*, 47 (2): 229-231.
- Mejia, J. P.(2002). *Histologia Veterinaria*. (pp. 74-78).
- Meluleni, G.J., Grout, M., Evans, D.J. & Pier, G.B. (1995). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in biofilme in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patient. *Journal of Immunology*, 155:2019-2038.
- Monroe, D. (2007). Looking for Chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 5:e307.
- Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S. & Rankin, S.C. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-2004). *Veterinary Dermatology*, 17 (5), 332-337.

- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. & Pfaller, M.A. (2006). *Microbiología Médica*. (5^a ed.). Elsevier.
- Nijland, R., Hall, M. & Burgess, J.G. (2010). Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. *PLoS ONE*, 5(12) e15668.
- Noli, C. (2003). Staphylococcal pyoderma. In BSAVA: manual of small animal dermatology, (2nd ed). (159-168). UK: British small animal veterinary association.
- Oliveira, J.D.C., Pimentel, J.O., Macedo, S.R.A., Mota, O.M.L., Rocha, M.M.N.P. & Perreira, S.L.S. (2009). Efeito do iodo-povidine sobre microrganismos de biofilme subgingival: estudo experimental in vitro. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*, 11(3):4-8.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S., Carneiro, C., Cavaco, L., Bernardo, F. & Vilela, C. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*, 118, 133-140.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322:207-228.
- Paterson, S. (2008). *Manual of skin diseases of the dog and cat*. (2nd ed.). (pp. 26-56). Blackwell Publishing.
- Plumb, D.C. (2008). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. (6th ed.). Blackwell Publishing: Iowa.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (1999). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (pp. 43-49). Blackwell Science
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terjecky, O.D. & Young, J.M. (2005). Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 312, 417-423.
- Roberts, A.P.; Mullany, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8:12, 1441-1450.
- Ryder, M.A. (2005). Biofilm Recalcitrance to Antimicrobials. *Advanced Practice Nursing eJournal* 5(3).
- Rubin, J.E., Ball, K.R. & Chirino-Trejo, M. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Canadian Veterinary Journal*, 52:153-157.
- Rusher, C., Lübke-Becker, A., Wlekinski, C-G., Soba, A., Wieler, L.h. & Walter, B. (2009). Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Veterinary Microbiology*, 136, 197-201.
- Scott, D. W., Miller, W.H. & Griffin, C. E. (1997). *Dermatologia en Pequeños Animales*. (5^a ed.). (pp. 317-340). Editorial Inter-Medica.

- Shiau, A.L. & Wu, C.L. (1998). The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Journal of Microbiology and Immunology*, 42:33-40.
- Souli, M. & Giamarellou, H. (1998). Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42:939-941.
- Susi, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P. & Geesey, G.G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38:2125-2133.
- Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3–9.
- Tavares, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(3): 281-301.
- Terauchi, R., Sato, H., Endo, Y, Aizawa, C. & Maehara, N.(2003). Cloning of the gene coding for *Staphylococcus intermedius* exfoliative toxin and its expression in *Escherichia*. *Veterinary Microbiology*, 94:32-38.
- Tresse, O., Jouenne, T. & Junter, G.-A. (1995). The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and B-lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36:521-526.
- Wart, K.H., Olson, M.E., Lam, K. & Costerton, J.W. (1992). Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *Journal of Medical Microbiology*, 36: 406-413.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000). Biofilms, city of microbes. *Journal of bacteriology*, 182, 2675-2679.
- William, J. B. Jr., Linda, M.B. (2003). *Atlas Colorido de Histologia Veterinária*. (2ª ed.). (pp. 139-141). São Paulo: Editora Roca Ltda.
- Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M. & Greenberg, E.P. (2004). Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of bacteriology*, 186(6), 1838-1850.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J. & Yokota, T. (1994). Interactions between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *Journal of Medical Microbiology*, 41:359-367.
- Yung-Hua, L., Lau, P.C.Y., Lee, J.H., Ellen, R.P., Cvitkovitch D.G. (2001). Natural genetic transformation of *Streptococcus mutants* growing in biofilms. *Journal of bacteriology*, 183:897-908.
- Zanatta, F.B. & Rösing, C.K. (2007). Chlorhexidine: actions mechanisms and recent evidences of its efficacy over supragingival biofilme context. *Scientific-A*, 1(2):35-43.